



**Andreia Filipa Sousa  
Ferreira**

**Filmes à base de quitosana enriquecidos com  
extratos de bagaço de uva**



**Andreia Filipa Sousa  
Ferreira**

**Filmes à base de quitosana enriquecidos com  
extratos de bagaço de uva**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Nunes, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.

## **o júri**

presidente

**Professor Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**  
investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

**Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes**  
professor assistente do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

orientador

**Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

co-orientador

**Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes**  
bolseira de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Nunes pelo apoio, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e por tornarem a finalização do meu mestrado possível.

Aos meus colegas de laboratório da Unidade de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares (QOPNA) pela constante ajuda prestada e pelo companheirismo.

À Fátima, Ana, Mariana, Vanessa, Cátia, Daniel, Nuno, Danny, Márcio e todos os outros meus amigos pela amizade, força e motivação que me transmitiram ao longo de todo o meu percurso académico.

Aos meus pais e aos meus irmãos por acreditarem sempre em mim.

Obrigada.

## palavras-chave

Filmes de quitosana, bagaço de uva, solubilidade, atividade antioxidante, propriedades mecânicas, propriedades antimicrobianas

## resumo

Os filmes obtidos a partir de recursos naturais e renováveis têm sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos. Entre estes, os constituídos à base de quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina que apresenta propriedades importantes para a aplicação na área alimentar, nomeadamente, atividade antioxidante e antimicrobiana, propriedades biofuncionais e biocompatíveis, biodegradabilidade, não toxicidade e capacidade de formar filmes com boas propriedades mecânicas. O bagaço de uva, constituído pelas grainhas, películas e engaços, é o principal subproduto da indústria vinícola. Este subproduto, que geralmente é descartado, é constituído por compostos de interesse como triacilglicerídeos, tocoferóis e polifenóis.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes à base de quitosana com extratos do bagaço de uva incorporados, de forma a melhorar as suas propriedades antioxidantes e de insolubilidade, mantendo as propriedades mecânicas e antimicrobianas dos filmes.

Neste estudo foram obtidas três frações do bagaço de uva: 1) o extrato obtido com água quente constituído por 72 % de polissacarídeos, 20 % de proteínas e 6 % de compostos fenólicos totais, 2) as ceras extraídas com clorofórmio e 3) o óleo, obtido por extração com *n*-hexano, constituído por cerca de 70 % de ácido linoleico (C18:2) e 18 % de ácido oleico (C18:1). Os três extratos foram incorporados na solução de quitosana (1,5 % m/v) e os filmes foram obtidos por evaporação do solvente.

A solubilidade dos vários filmes foi determinada em água (pH=6,5) e numa solução hidro-alcoólica ácida (pH=3,5). Os filmes com os óleos incorporados na proporção de 1:5 (óleo:quitosana) obtiveram uma redução de 27 % de perda de massa na solução ácida em relação ao filme controlo constituído apenas por quitosana. Os restantes filmes não apresentaram diferenças significativas de solubilidade em relação ao filme de quitosana.

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada por diferentes métodos (ABTS, DPPH, FRAP e pelo método do poder redutor). Os filmes de quitosana com polissacarídeos, ceras e óleo demonstraram uma atividade antioxidante que pode ser até 3 vezes superior, dependendo do método, relativamente ao controlo, demonstrando a importância da incorporação destes extratos nos filmes.

Os ensaios mecânicos permitiram demonstrar que a incorporação dos vários extratos não prejudica as características mecânicas dos filmes de quitosana.

Os filmes de quitosana e quitosana com óleo incorporado demonstraram atividade antimicrobiana de fungos no pão e de bactérias no sumo de maçã.

Em conclusão, os filmes de quitosana produzidos por incorporação dos extratos obtidos do bagaço de uva, principalmente o das ceras e do óleo, parecem ser promissores para futuras aplicações alimentares.

## keywords

Chitosan films, grape pomace, solubility, antioxidant activity, mechanical properties, antimicrobial properties.

## abstract

The study of the films obtained from natural and renewable sources have greatly increased in recent years. From these, those composed by chitosan, a polysaccharide derived from chitin which has important properties for food industry such as antioxidant, antimicrobial, biocompatible, biofunctional, biodegradability, non-toxicity and the great ability to form films with good mechanical properties. The grape pomace, which includes seeds, skins and stems, is an important by-product of winemaking industry. This wine by-product is usually discarded thought containing valuable compounds such as triglycerides, tocopherols and polyphenols, which could have application in the food industry.

The aim of this work was to develop chitosan-based films with incorporation of grape pomace extracts in order to improve their insolubility and antioxidant properties, keeping their mechanical and antimicrobial properties.

In this study, three fractions were obtained from grape pomace: 1) hot water extract consisting of 72 % polysaccharides, 20 % proteins and 6 % total phenolic compounds, 2) waxes, extracted with chloroform and 3) oil, obtained with n-hexane, comprising about 70 % linoleic acid (C18:2) and 18 % oleic acid (C18:1). These three extracts were added to a chitosan solution (1.5% w / v) and the films were obtained by solvent casting.

The solubility of the chitosan-based films was determined in water (pH=6,5) and in an acidic hydro-alcoholic solution (pH=3,5). The chitosan-based films with incorporation of the oil in a ratio of 1:5 (oil:chitosan) showed a decrease of 27 % of weight loss in acidic solution comparing with control chitosan films. The remaining films did not show significant differences comparing with the solubility of the control film.

The antioxidant activity of the chitosan-based films was determined by four different methods (ABTS, DPPH, FRAP and the reducing power essay). The chitosan-based films with polysaccharides, wax and oil demonstrated an antioxidant activity that can be up to 3 times higher, relative to the control, depending on the method of analysis. These results demonstrated the importance of incorporating these extracts in the chitosan films.

Mechanical tests showed that the incorporation of the three extracts in chitosan films did not affect significantly the mechanical properties. Also, the chitosan-based films demonstrated antimicrobial activity against fungi on bread and bacteria in apple juice.

In conclusion, the chitosan-based films prepared by incorporation of extracts obtained from grape pomace, mainly waxes and oil, seem to be promising for food applications.

## ÍNDICES





# ÍNDICE

Índice .....	iii
Lista de tabelas .....	v
Lista de figuras .....	vi
Lista de abreviaturas .....	x
1. INTRODUÇÃO TEÓRICA .....	1
1.1. Introdução .....	3
1.2. Filmes e revestimentos .....	3
1.3. Quitosana .....	8
1.4. Filmes à base de quitosana .....	18
1.5. Subproduto da indústria vinícola: o bagaço de uva .....	25
1.6. Âmbito do trabalho .....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
2.1. Extratos do bagaço de uva .....	31
2.2. Caracterização dos extratos .....	32
2.3. Filmes à base de quitosana .....	40
2.4. Análise estatística .....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.1. Obtenção e caracterização dos extratos do bagaço de uva .....	51
3.1.1. Extrato de água quente .....	51
3.1.2. Óleo da grainha .....	54
3.1.3. Ceras .....	56
3.2. Produção e caracterização de Filmes à base de quitosana .....	57
3.2.1. Humidade e solubilidade .....	58
3.2.2. Atividade antioxidante .....	59

3.3. Produção e caracterização de um novo conjunto de filmes à base de quitosana.	66
3.3.1.FTIR aos filmes.....	66
3.3.2.Humidade e solubilidade.....	68
3.3.3.Atividade antioxidante .....	70
3.3.4.Propriedades mecânicas .....	76
3.3.5.Ângulos de contacto e energias de superfície .....	79
3.3.6.Propriedades antimicrobianas .....	82
4. CONCLUSÕES .....	88
5. TRABALHO FUTURO .....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Fontes naturais de quitina [18].....	8
<b>Tabela 2</b> – Relação entre as propriedades biológicas da quitina e da quitosana e as suas características físico-químicas.....	10
<b>Tabela 3</b> – Estirpes suscetíveis à ação antimicrobiana da quitosana [23]. ....	13
<b>Tabela 4</b> – Resumo das aplicações biomédicas, alimentares e outras da quitosana.....	16
<b>Tabela 5</b> – Filmes à base de quitosana com proteínas, polissacarídeos e poliésteres e as suas propriedades mecânicas, de permeabilidade e antimicrobianas. ....	20
<b>Tabela 6</b> – Filmes à base de quitosana com incorporação de óleos e as suas propriedades mecânicas, de permeabilidade e antimicrobianas.....	24
<b>Tabela 7</b> – Ácidos gordos nas grainhas e no bagaço de uva.....	26
<b>Tabela 8</b> – Proporção de extratos:quitosana dos vários filmes preparados .....	40
<b>Tabela 9</b> – Caracterização química dos extratos obtidos com água quente a partir do bagaço de uva. ....	51
<b>Tabela 10</b> – Composição em monossacarídeos (mol %) dos extratos do bagaço de uva obtidos com água quente. ....	52
<b>Tabela 11</b> – Composição do óleo das grainhas das uvas em ácidos gordos. ....	54
<b>Tabela 12</b> – Propriedades mecânicas dos filmes à base de quitosana com polissacarídeos, ceras e óleo incorporados. ....	77

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Diferentes tipos de biopolímeros usados para embalagem (adaptado de Srinivasa <i>et al.</i> [2]).	4
<b>Figura 2</b> – Fotografia de uma maçã revestida com filme de quitosana (A) e outra não revestida (B) após oito dias de armazenamento sem refrigeração.	7
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da quitina (A) e de quitosana (B) [4, 17].	8
<b>Figura 4</b> – Processo geral de obtenção da quitina e da quitosana (adaptado de Aranaz <i>et al.</i> [17]).	9
<b>Figura 5</b> – Complexação de um ião metálico à quitosana de acordo com o modelo descrito por Wang <i>et al.</i> [24].	11
<b>Figura 6</b> – (a) Cromatógrafo em fase gasosa (Clarus 400, Perkin Elmer); (b) Programa de temperaturas do GC.	34
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática das reações envolvidas no método do ácido bicinconínico para a determinação da proteína solúvel [72].	35
<b>Figura 8</b> – (a) Cromatógrafo em fase gasosa (Clarus 400, Perkin Elmer); (b) Programa de temperaturas do GC.	37
<b>Figura 9</b> – Formação do catião radical ABTS <sup>•+</sup> (adaptado de Huang <i>et al.</i> [73]).	38
<b>Figura 10</b> – Reação do método de DPPH (adaptado de Huang <i>et al.</i> [73]).	39
<b>Figura 11</b> – Redução do Fe (III) para Fe (II) do método FRAP (adaptado de Huang <i>et al.</i> [73]).	43
<b>Figura 12</b> – Esquema do ângulo de contacto para uma gota de água molhante sobre superfície do filme [84].	46
<b>Figura 13</b> – Espetro de FTIR do extrato C.	54
<b>Figura 14</b> – Espetro de FTIR ao óleo das grainhas das uvas.	55
<b>Figura 15</b> – Espetro de FTIR às ceras das películas das uvas.	56
<b>Figura 16</b> – Percentagem de humidade do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p \leq 0,05$ e $n=3$ )	58
<b>Figura 17</b> – Solubilidade (% perda de massa) do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e	

1:5) em água e numa solução ácida (pH 3,5) com 10% de etanol. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	59
<b>Figura 18</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de ABTS em água, ao longo do tempo: (a) até 2,5 h e (b) até 10 h de reação. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ).....	60
<b>Figura 19</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de ABTS em etanol ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	61
<b>Figura 20</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de DPPH, ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	62
<b>Figura 21</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de FRAP, ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	64
<b>Figura 22</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método do poder redutor, após 30 minutos de reação. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	65
<b>Figura 23</b> – Espectro de FTIR do filme de quitosana (filme controlo). .....	67
<b>Figura 24</b> – Espectro de FTIR dos filmes à base de quitosana com óleo incorporado na razão de (a) 1:5 (óleo 1:5) e (b) 1:2 (óleo 1:2). .....	68
<b>Figura 25</b> – Percentagem de humidade do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2). ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	68
<b>Figura 26</b> – Solubilidade (% perda de massa) do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5	

e 1:2) em água e numa solução ácida (pH 3,5) com 10% de etanol. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	69
<b>Figura 27</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em água, ao longo do tempo: (a) após 3 h (b) após 9 h. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ).....	70
<b>Figura 28</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em etanol, ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	71
<b>Figura 29</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de DPPH, ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	72
<b>Figura 30</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de FRAP, ao longo do tempo. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	73
<b>Figura 31</b> – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em água, após 30 minutos de reação. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	73
<b>Figura 32</b> – Atividade antioxidante de filmes neutralizados e não neutralizados (controlo, polissacarídeos 1:10, ceras 1:10) após 24 horas de reação, pelo método de ABTS em etanol e pelo método de DPPH. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	75
<b>Figura 33</b> – Atividade antioxidante dos filmes neutralizados e não neutralizados (controlo, polissacarídeos 1:10, ceras 1:10) após 30 minutos de reação, pelo método do poder redutor. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=3</math></i> ) .....	76
<b>Figura 34</b> – Ângulos de contacto (usando água como solvente) da superfície dos filmes de quitosana (controlo), e de quitosana com polissacarídeos, óleo e ceras. ( <i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, <math>p \leq 0,05</math> e <math>n=9</math></i> ) .....	79

<b>Figura 35</b> – Gota de água pura, formamida e di-iodometano no momento em que entra em contato com a superfície do filme à base de quitosana: A) Filme controlo; B) filme com polissacarídeos 1:10; (C) filme com óleo 1:2.....	81
<b>Figura 36</b> – Energia de superfície, fase dispersiva e fase polar dos filmes de quitosana (controlo) e de quitosana com polissacarídeos, óleo e ceras. ....	82
<b>Figura 37</b> – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água no início do teste. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controlo; (C) tubo com filme com óleo 1:2. ....	83
<b>Figura 38</b> – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água após 4 horas. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controlo; (C) tubo com filme com óleo 1:2.....	83
<b>Figura 39</b> – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água após 6 dias. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controlo; (C) tubo com filme óleo 1:2.....	84
<b>Figura 40</b> – Tubos de ensaio contendo sumo de maçã. (A) branco (sem filme); (B) tubo com filme controlo; (C) tubo com filme óleo 1:2. (1) tempo 0; (2) após 24 horas; (3) após 4 dias.....	84
<b>Figura 41</b> – Evolução da densidade ótica do sumo sem filme, com o filme controlo e com o filme com óleo 1:2 ao longo de 5 dias.....	85



## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Denominação
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AcOH	Ácido acético
Ác. Ur.	Ácidos urónicos
Ara	Arabinose
BCA	Ácido bicinconínico
DPPH	2,2'-difenil-1-picril-hidrazilo
<i>E</i>	Taxa de deformação ou elongação
FAME	Fatty Acids Methyl Esters – ésteres metílicos de ácidos gordos
FRAP	Ensaio de poder antioxidante do ferro
FT	Força de tensão
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa - detetor por ionização de chama
GD	Grau de desacetilação
Glc	Glucose
IPS	Isolado de proteína de soja
Man	Manose
Mm	Massa molecular
Mol %	Percentagem molar
PCL	Poli-ε-caprolactona
PO	Permeabilidade ao oxigénio
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
Rha	Ramnose
rpm	Rotação por minuto
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

## **1. INTRODUÇÃO TEÓRICA**



## **1.1. INTRODUÇÃO**

O consumo anual de plásticos tem aumentado continuamente, e representa, atualmente, cerca de 100 milhões de toneladas. Aproximadamente 56 % de todo o volume desses plásticos é utilizado em embalagens [1]. A maior parte dessas embalagens são utilizadas uma vez e depois descartadas, o que contribui consideravelmente para o fluxo total de resíduos (aproximadamente 20 % do volume total a nível mundial). A eliminação destes resíduos é difícil, e portanto, tem um impacto muito significativo no meio ambiente [2]. Estes resíduos criam problemas de poluição visual e podem ter efeitos nocivos para os animais por não serem biodegradáveis [3]. Além disso, os plásticos são polímeros derivados do petróleo, um recurso fóssil esgotável. No entanto, estes polímeros de origem petroquímica continuam a ser largamente utilizados porque são produzidos facilmente, a baixo custo e têm uma elevada resistência, flexibilidade e durabilidade [4].

Com o intuito de resolver os problemas ambientais que advêm da utilização excessiva de plásticos, tem-se verificado um crescente interesse em desenvolver novos materiais biodegradáveis. Estes novos materiais podem ser obtidos a partir de várias fontes naturais, como as proteínas, polissacarídeos e lípidos ou também poliésteres naturais produzidos por diversos microrganismos [5]. A substituição total dos polímeros petroquímicos pelos biopolímeros ainda não é possível, devido às suas características físico-químicas e aos maiores custos de produção. É portanto, necessário prosseguir com os estudos para melhorar as propriedades dos materiais produzidos com estes polímeros naturais para que possam ser utilizados comercialmente [6].

## **1.2. FILMES E REVESTIMENTOS**

Nos últimos anos, tem havido um aumento continuado na pesquisa de biopolímeros para diversos fins, nomeadamente, para aplicações alimentares, dado que muitos destes polímeros, para além de serem biodegradáveis, possuem também propriedades antimicrobianas e antioxidantes [2]. Alguns destes biopolímeros têm também a capacidade de formar filmes, que podem ser usados como embalagem ou revestimento para preservação de alimentos.

Os filmes são geralmente definidos como camadas finas de materiais que podem ser utilizados como coberturas, camadas de separação ou embalagens. Os revestimentos consistem na formação dos filmes diretamente na superfície dos produtos. Estes últimos são considerados como fazendo parte do produto final, sendo uma cobertura adicional [7].

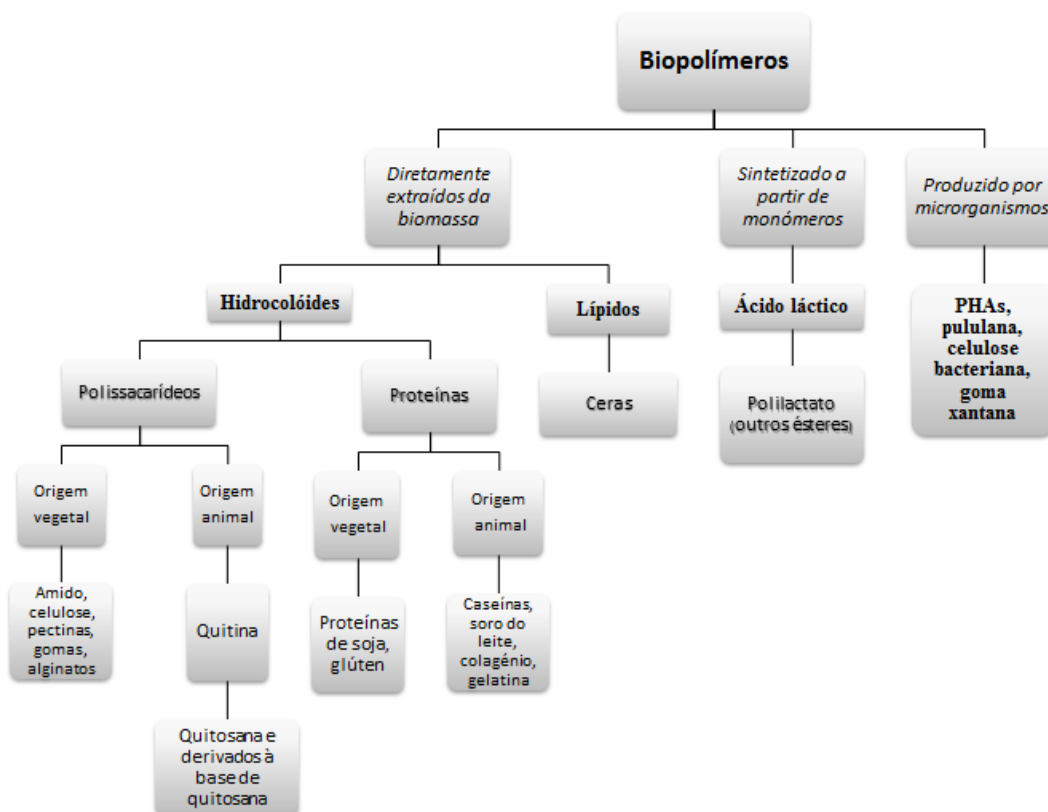
### 1.2.1. Materiais usados na sua produção

De uma forma geral, os biopolímeros que formam filmes biodegradáveis podem ser divididos em três categorias, de acordo com a sua origem (Figura 1) [2]:

Polímeros diretamente extraídos da biomassa: 1) polissacarídeos (amido, celulose, pectinas ou quitina/quitosana); 2) proteínas (caseína ou glúten); 3) lípidos (ácidos gordos, resinas e ceras).

Polímeros produzidos por síntese química usando monómeros, como o ácido polilático, um biopoliéster polimerizado a partir do ácido láctico.

Polímeros produzidos por microrganismos, como por exemplo a pululana e os hidroxipolialcanoatos (PHAs).



**Figura 1** – Diferentes tipos de biopolímeros usados para embalagem (adaptado de Srinivasa *et al.* [2]).

Os polímeros extraídos diretamente da biomassa têm demonstrado um crescente interesse, devido não só às suas propriedades físico-químicas, mas também devido à sua biodisponibilidade. Estes são os polímeros mais abundantes na natureza e geralmente são subprodutos resultantes da indústria e da agricultura. Assim, a utilização destes resíduos conduz à sua valorização económica e à diminuição do seu volume no meio ambiente [2].

Os polímeros extraídos da biomassa também podem ser divididos de acordo com os seus componentes, em três categorias: hidrocolóides, lípidos e compósitos. Dos hidrocolóides fazem parte os polissacarídeos e as proteínas; os lípidos incluem as ceras e, por sua vez, os compósitos são uma mistura de hidrocolóides com lípidos [8].

Os filmes e revestimentos preparados com polissacarídeos são bastante resistentes e geralmente representam uma boa barreira ao oxigénio quando a humidade relativa é baixa, por serem altamente polares (contêm grupos hidroxilo) [9]. No entanto, são uma pobre barreira à humidade, devido à sua natureza hidrofílica [4].

As proteínas têm sido muito estudadas devido à sua capacidade de formar filmes e revestimentos. Estes podem ser feitos a partir de glúten, proteína de soja, proteína de soro, caseínas, gelatina/colagénio, queratina, entre outros. Estes filmes apresentam boas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigénio, mas a permeabilidade ao vapor de água é elevada. Outra desvantagem destes filmes é a existência de intolerâncias ou alergias alimentares a alguns destes compostos, tais como às proteínas do leite ou ao glúten, que devem ser tidas em conta quando são feitos filmes à base destes polímeros [8].

Os lípidos, devido à sua natureza hidrofóbica, são usados em filmes para aumentar a barreira à humidade. Além disso, também são usualmente utilizados para dar brilho à superfície dos alimentos. Os lípidos usados na preparação de filmes incluem triglicerídeos, ácidos gordos, ceras e resinas. No entanto, como não são polímeros, a sua resistência mecânica é baixa [8].

Os filmes compósitos constituídos por hidrocolóides e lípidos aumentam as vantagens e reduzem as desvantagens que cada um dos componentes tem individualmente. Um filme compósito pode ser tanto produzido como uma bicamada ou como uma emulsão estável. Nos filmes compósitos bicamada, os lípidos formam uma segunda camada acima da camada dos polissacarídeos ou das proteínas. Nos filmes compósitos de emulsão, os lípidos são dispersos e misturados na matriz de suporte de polissacarídeos ou proteínas. A eficiência destes filmes depende da estrutura dos lípidos, do arranjo químico, da

hidrofobicidade, do estado físico e da sua interação com os outros componentes do filme [8].

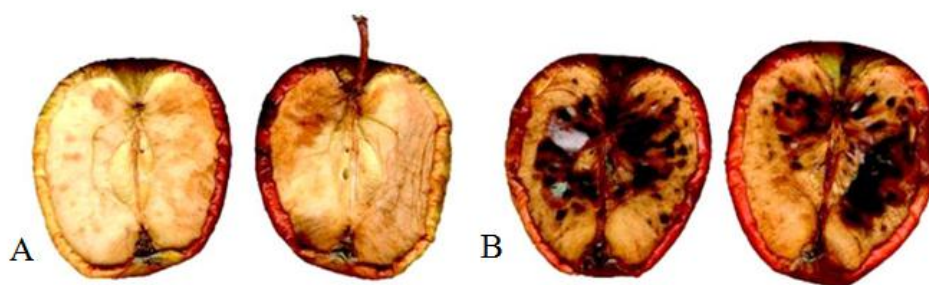
Para além dos biopolímeros, os filmes podem também ser constituídos por outros materiais que são adicionados à matriz para melhorarem algumas propriedades e os tornarem mais apropriados à sua aplicação. Entre estes materiais encontram-se os plastificantes e os emulsificantes.

Os plastificantes são compostos de baixa massa molecular, não voláteis, com elevado ponto de ebulição que são adicionados a outros materiais para alterar as suas propriedades físicas e/ou mecânicas [9]. Os plastificantes diminuem as forças intermoleculares ao longo das cadeias dos polímeros e aumentam o espaço intermolecular, o que resulta num filme com melhores propriedades em termos de flexibilidade e alongação. No entanto, diminuem as propriedades de barreira. A sacarose, o glicerol, o sorbitol, o propileno glicol, o polietileno glicol (PEG), os ácidos gordos e monoglicerídeos são exemplos de alguns dos plastificantes mais utilizados [9, 10].

Os emulsificantes ou surfactantes são compostos de natureza anfipática que interagem na interface água-lípidos e reduzem a tensão superficial entre a fase dispersa e contínua para melhorar a estabilidade da emulsão. Estes podem também assegurar uma boa adesão do revestimento à superfície do alimento. Os emulsificantes mais comuns usados nos filmes e revestimentos são os ácidos gordos, o glicerol monoestearato, os ésteres de ácidos gordos ou a lecitina [11].

### **1.2.2. Propriedades e funções**

Os filmes produzidos a partir de biopolímeros visam aumentar a qualidade, a segurança microbiológica, a estabilidade e a aparência dos produtos alimentares, de forma a aumentarem o seu tempo de prateleira [4]. Como exemplo, num estudo, a utilização de um revestimento de quitosana, que possuía propriedades antimicrobianas, evitou o aparecimento de fungos em maçãs após 8 dias de armazenamento sem refrigeração, tal como se pode verificar na Figura 2 [12].



**Figura 2** – Fotografia de uma maçã revestida com filme de quitosana (A) e outra não revestida (B) após oito dias de armazenamento sem refrigeração.

Uma das principais funções dos filmes e revestimentos é oferecer uma barreira de proteção de forma a modelar a transferência de gases, como o oxigénio e o dióxido de carbono e reduzir a perda de humidade e aromas entre o alimento e o ambiente. As propriedades de barreira mais comumente estudadas são a permeabilidade ao vapor de água (PVA) e a permeabilidade ao oxigénio (PO), permitindo perceber se os filmes podem ser utilizados para proteger os alimentos frescos ou processados do meio ambiente [8]. Baixos valores de permeabilidade ao vapor de água são pretendidos para evitar a desidratação dos alimentos. Enquanto a água é apenas fracamente e reversivelmente ligada aos frutos por pontes de hidrogénio, o oxigénio reage fortemente e irreversivelmente. Assim, a entrada de oxigénio conduz a uma permanente alteração (deterioração oxidativa) dos produtos alimentares. Uma ótima barreira ao oxigénio é crucial para se alcançar um tempo de prateleira mais longo [13]. O aumento da resistência à difusão de dióxido de carbono e oxigénio, concomitantemente, reduz a taxa de respiração o que conduz a um novo equilíbrio de concentração dos gases nos produtos alimentares. Portanto, a criação de um microclima com recursos a estas barreiras semipermeáveis é uma boa alternativa para a preservação de frutos e vegetais [2].

Além disso, os filmes também mantêm a integridade do alimento por contribuírem para a sua proteção física e mecânica (danos mecânicos durante o transporte ou o armazenamento). A capacidade dos filmes em proteger os alimentos contra os danos físicos depende das propriedades mecânicas inerentes a cada filme. Estas propriedades traduzem o comportamento dos filmes quando sujeitos a uma tensão ou deformação.

Os filmes e revestimentos podem também ser utilizados como portadores de outros compostos que permitem melhorar as suas propriedades. Estes compostos podem ser antioxidantes, corantes, reguladores de crescimento e agentes antimicrobianos que depois

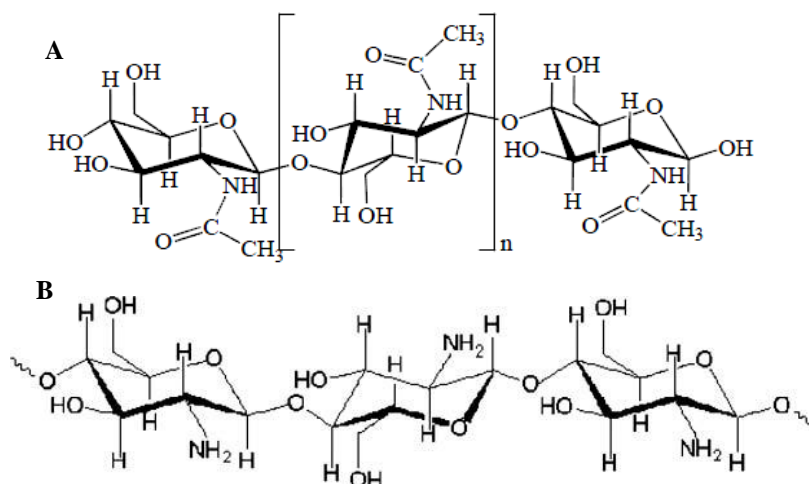


são libertados na superfície dos alimentos para incrementar a qualidade sensorial e segurança microbiológica do alimento [14].

### 1.3. QUITOSANA

#### 1.3.1. Caracterização

A quitina é o precursor direto da quitosana. A quitina é um polissacarídeo linear de elevada massa molecular, constituído essencialmente por unidades de  $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucose (N-acetil-D-glucosamina) (Figura 3), apresentando uma cadeia similar à da celulose, exceto pela substituição dos grupos hidroxilo na posição 2 por grupos acetamida [15, 16].



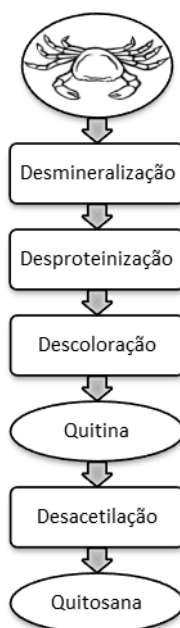
**Figura 3** – Estrutura química da quitina (A) e de quitosana (B) [4, 17]

Este biopolímero é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, logo a seguir à celulose [4] e trata-se do maior constituinte do exoesqueleto dos crustáceos [16], podendo, no entanto, ser também encontrado em insetos, fungos, leveduras, entre outros (Tabela 1).

**Tabela 1** – Fontes naturais de quitina [18]

Animais marinhos	Insetos	Microrganismos
Caranguejo	Escorpiões	Fungos
Moluscos	Aranhas	Leveduras
Lagosta	Formigas	Esporos
Camarão	Besouros	

Uma vez que a biodegradação da quitina nos resíduos da indústria dos crustáceos é muito lenta, a acumulação de grandes quantidades deste resíduo nas zonas costeiras torna-se inevitável. Globalmente produzem-se cerca de 100 milhões de toneladas de quitina [2]. Desta forma, a produção de produtos de valor acrescentado a partir destes resíduos industriais tem um interesse acrescido. A partir de uma simples desmineralização para remoção do carbonato de cálcio (tratamento com ácido clorídrico diluído a quente) e uma desproteínização (tratamento com hidróxido de sódio diluído a quente), a quitina pode ser recuperada dos subprodutos da indústria dos crustáceos (Figura 4) [2].



**Figura 4** – Processo geral de obtenção da quitina e da quitosana (adaptado de Aranaz *et al.*[17])

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, obtendo-se um polímero linear de elevada massa molecular composto maioritariamente por unidades de  $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucose (D-glucosamina) (Figura 3 B) [16].

A quitosana é preparada pela hidrólise dos grupos acetamida da quitina em condições alcalinas severas, formando-se grupos amina. Geralmente é utilizado hidróxido de potássio ou de sódio com uma concentração de 30-50 % (w/v) a elevadas temperaturas (100 °C) [17]. No entanto, esta reação de desacetilação é, na maior parte das vezes, apenas parcial mesmo em condições extremas, levando a que a cadeia polimérica de quitosana seja comumente descrita como um copolímero de unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e D-glucosamina (GlcN). A diferença entre quitina e quitosana reside no grau de desacetilação (GD), ou seja, no número médio de unidades de glucosamina por 100

unidades monoméricas na cadeia de quitosana. Convencionalmente, trata-se de quitosana quando esta tem um grau de desacetilação superior a 60 %, no entanto, este varia normalmente entre 70 a 95 %, dependendo do método utilizado [19].

A quitosana tem três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amina, um grupo hidroxilo primário e um grupo hidroxilo secundário nas posições C-2, C-3 e C-6, respetivamente [20]. Estes grupos reativos conferem à quitosana uma série de características, nomeadamente: 1) capacidade para formar géis e filmes com boas propriedades mecânicas [15], 2) propriedades biofuncionais e biocompatíveis com órgãos, tecidos e células de animais e plantas [3], 3) biodegradabilidade [3], 4) propriedade antimicrobiana [21], 5) capacidade antioxidante [17], 6) não tóxica [22], 7) quelatação de metais pesados [4], 8) propriedade anticolesterolémica [17] e 9) capacidade de poder ser modificada química e enzimaticamente [19].

### 1.3.2. Propriedades físico-químicas

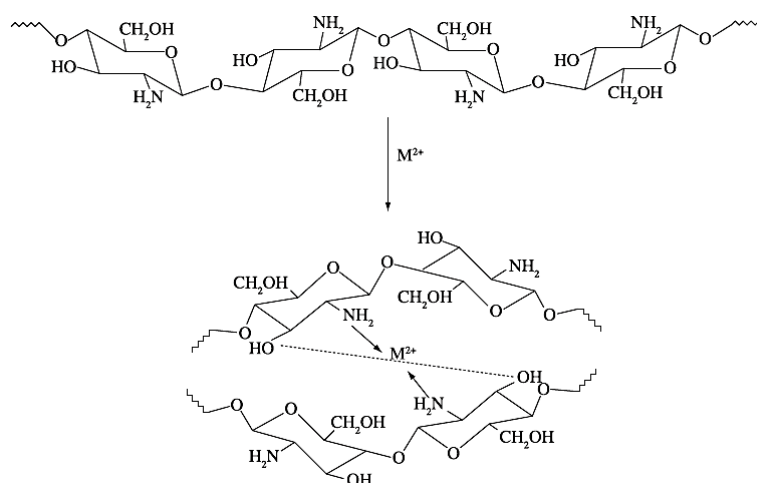
As diferentes propriedades físico-químicas da quitosana, nomeadamente o grau de desacetilação (GD), a massa molecular (Mm) e a viscosidade influenciam as suas propriedades biológicas e as suas possíveis aplicações, tal como está representado na Tabela 2 [17].

**Tabela 2** – Relação entre as propriedades biológicas da quitina e da quitosana e as suas características físico-químicas

Propriedade	Característica
Biodegradabilidade	GD, distribuição dos grupos acetilo, Mm
Biocompatibilidade	GD
Analgésico	GD
Adsorção	GD
Antimicrobiana	GD, Mm
Anticolesterolémica	GD, Mm, viscosidade
Antioxidante	GD, Mm

Quanto maior o grau de desacetilação (GD), mais reativa se torna a molécula por ter mais grupos amina. Os grupos amina fazem da quitosana um polieletrólito catiónico (pKa = 6,5) [22]. Em consequência disto, a quitosana é insolúvel em água, soluções básicas

e solventes orgânicos, mas é solúvel na maioria das soluções orgânicas ácidas quando o pH da solução é menor que 6,5. Em meio aquoso ácido a quitosana tem cargas positivas nos grupos amina ( $\text{NH}_3^+$ ) que conferem a este polímero a capacidade de aderir moléculas com carga negativa e têm também alguns grupos amina na forma neutra ( $\text{NH}_2$ ) capaz quelatar iões positivos [22]. Assim, a quitosana é um bom agente coagulante e floculante devido à elevada densidade de grupos amina, que podem interagir com as substâncias carregadas negativamente, como algumas proteínas e polissacarídeos. No entanto, a quitosana comporta-se de uma forma diferente no que diz respeito aos iões metálicos de transição. O azoto no grupo amina da molécula de quitosana atua como dador de eletrões e é presumivelmente responsável pela quelatação seletiva com os iões metálicos. O grupo amina livre na quitosana é mais efetivo a ligar iões metálicos que o grupo acetilo na quitina. O que leva a considerar que quanto o maior índice de grupos amina livres da quitosana, maior a taxa de quelatação de iões metálicos. No entanto, a capacidade de quelatação da quitosana é dependente de muitos outros fatores, como a cristalinidade, a solubilidade e o pH [19]. De uma forma geral, o mecanismo de quelatação é mais eficiente a elevado pH, pois os grupos amina não estão protonados e o par de eletrões do azoto da amina está disponível para doar os eletrões aos iões metálicos. O pH determina a proporção de locais disponíveis para interação na cadeia do polímero [23]. Segundo o modelo proposto por Wang *et al.* [24], o metal é o aceitador de eletrões e está ligado a uma ou mais cadeias de quitosana através do  $\text{NH}_2$  e forma pontes com o grupo hidroxilo, como está representado na Figura 5.



**Figura 5** – Complexação de um ião metálico à quitosana de acordo com o modelo descrito por Wang *et al.* [24].

A massa molecular (Mm) da quitina nativa é normalmente maior que um milhão de Daltons, enquanto a quitosana comercial mais comum varia entre 100 e 1000 kDa. As condições severas a que a quitosana é sujeita durante o processo de extração podem conduzir à sua degradação e consequente redução do tamanho das moléculas [19].

A viscosidade é outra importante propriedade físico-química. Esta é influenciada por diversos fatores, como o grau de desacetilação do polímero, a massa molecular, a concentração de quitosana, a força iónica, o pH e a temperatura. De uma forma geral, quando a temperatura aumenta, a viscosidade do polímero em solução diminui. No entanto, uma alteração do pH na solução do polímero pode originar diferentes resultados dependendo do tipo de ácido. Em soluções aquosas com ácido acético, a viscosidade da quitosana tende a aumentar com a diminuição do pH, enquanto com ácido clorídrico a viscosidade diminui quando o pH é baixo. A viscosidade intrínseca da quitosana depende do grau de ionização e da força iónica. Um aumento tanto no grau de ionização da quitosana como da força iónica conduz à diminuição da viscosidade intrínseca da solução de quitosana [19].

### **1.3.3. Propriedade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da quitosana tem sido demonstrada para muitas bactérias, fungos filamentosos, leveduras [21] e vírus [25]. A quitosana tem algumas vantagens em relação a outros desinfetantes, dado que tem um largo espectro de ação e tem baixa toxicidade para as células mamíferas.

De uma forma geral, a quitosana tem sido considerada um bactericida (mata as bactérias) ou bacteriostático (inibe o crescimento bacteriano). Os mecanismos desta atividade ainda não são bem compreendidos, mas têm sido propostos vários modelos [22].

As interações electrostáticas entre as moléculas policationicas da quitosana e a carga negativa dos componentes das membranas, como os lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas e as proteínas da parede, têm sido vistas como sendo responsáveis pela perda da estrutura das membranas e pela consequente perda dos organelos celulares, dado que ocorre a despolarização das membranas celulares e ruptura da integridade das ligações moleculares levando à morte celular [22]. Portanto, maior densidade de cargas positivas, mais interações electrostáticas se dão entre o polímero e o microrganismo, logo maior o poder bacteriano. Por outro lado, está também descrito que a quitosana também

pode penetrar através da parede celular para o interior das células onde se liga ao DNA (carga negativa), o que vai interferir na síntese de mRNA e proteínas [22]. Assim, quanto menor for o polímero de quitosana, mais facilmente penetra na parede e núcleo. Por exemplo, Liu *et al.* [26] verificaram que oligómeros de quitosana entre 5 a 8 kDa penetraram dentro da *E.coli* e mostraram boa atividade antimicrobiana. Outro mecanismo de ação reside no facto da quitosana ter capacidade para quelatar nutrientes essenciais e iões metálicos importantes para a estabilização das membranas das bactérias, inibindo, consequentemente, o crescimento bacteriano. Finalmente, a desidratação, a gelificação, a inibição enzimática e as propriedades floculantes da quitosana são outras propriedades que podem estar envolvidas na ação antimicrobiana [22].

A eficácia bactericida ou bacteriostática da quitosana depende de vários fatores que estão divididos em quatro categorias: fatores microbianos, fatores intrínsecos da quitosana, estado físico da quitosana e os fatores ambientais.

A quitosana tem uma diferente inibição contra diferentes espécies microbianas. Nos fungos, atua tanto na supressão da esporulação como na germinação de esporos. Esta capacidade antifúngica é maior a valores de pH mais baixos. A quitosana também inibe bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas de forma diferente devido às diferenças na superfície destas bactérias. No entanto, o efeito antimicrobiano da quitosana nestas bactérias é, de certa forma, controverso. Alguns autores reportaram que a quitosana tem um efeito maior em Gram positivas do que em Gram negativas. No entanto, contrariamente, também foi demonstrado que o carácter hidrofílico das Gram negativas é consideravelmente mais elevado que o das Gram positivas, tornando-as mais sensíveis à quitosana. Na Tabela 3 constam algumas das estirpes bacterianas e alguns dos fungos inibidos pela quitosana, segundo a bibliografia [23].

**Tabela 3** – Estirpes suscetíveis à ação antimicrobiana da quitosana [23].

<b>Microrganismo</b>	<b>Estirpe</b>
Gram negativas	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Shingella dysenteriae</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>

Gram positivas	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Candida lambica</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Fungos	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Candida albicans</i>

O estado físico da quitosana também tem influência na sua ação. De uma forma geral, a quitosana solúvel e os seus derivados são mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano. Em comparação com a quitosana solúvel, a quitosana em estado sólido apenas entra em contacto com a solução através da superfície, daí que a sua ação antimicrobiana seja inferior [21].

Finalmente, a atividade antimicrobiana da quitosana é dependente de fatores ambientais, como a temperatura e o pH. A quitosana torna-se policationica a um pH inferior ao pKa da molécula (6,3-6,5). A quitosana mostra definitivamente um efeito inibitório mais forte a pHs mais baixos [27]. A dificuldade para a quitosana tornar-se bactericida a pH 7 pode ser devido à presença de poucas cargas positivas do grupo amina, assim como à fraca solubilidade da quitosana. Quando o pH é superior ao pKa, os efeitos hidrofóbicos e quelantes são responsáveis pela atividade antimicrobiana em vez do efeito electrostático [21]. A temperatura também constitui um fator ambiental importante. Estudos demonstraram que a suscetibilidade da *E. coli* à quitosana aumenta com o aumento da temperatura de 4 a 37 °C, sugerindo que a baixas temperaturas o stress provocou alterações na superfície das células, diminuindo a sua electronegatividade, logo o número de sítios onde a quitosana se podia ligar [28].

#### 1.3.4. Propriedades antioxidantes

Muitos antioxidantes são usados como aditivos alimentares, de forma a proteger compostos que são suscetíveis à degradação por oxidação e prevenir, desta forma, a prematura perda de qualidade desses alimentos. A prevenção da oxidação pode ocorrer por vários mecanismos: 1) captura de radicais livres, que estão associados a espécies reativas

de oxigénio (ROS) que causam o envelhecimento e a morte celular; 2) baixo potencial redox, oxidando-se em favor dos outros constituintes alimentares menos oxidáveis; 3) pela complexação de iões metálicos, que de outra forma iriam acelerar a oxidação lipídica, por facilitarem a transferência de eletrões nas reações [29].

A quitosana tem mostrado ter uma significativa capacidade de captar diferentes espécies de radicais, sendo os resultados obtidos para os oligossacarídeos comparáveis aos obtidos com antioxidantes comerciais, como o trolox [17, 30]. Estudos efetuados com quitosana revelaram que a sua atividade antioxidante depende quer do GD quer da Mm do polímero. Maiores valores de GD têm uma maior capacidade de captar esses radicais. Por outro lado, um estudo utilizando sumo de maçã, com quitosanas de diferentes tamanhos mostrou que a quitosana com baixa Mm tinha um efeito superior na eliminação de radicais de DPPH, peróxido de hidrogénio e superóxido relativamente a quitosanas com maiores Mm. Assim, quanto menor a Mm, maior a capacidade antioxidante [31].

A quitosana também exhibe propriedades antioxidantes devido à sua capacidade de formar complexos com muitos metais de transição [32]. A quitosana pode quelatar iões ferrosos e assim retardar a oxidação lipídica, pela eliminação da sua atividade pró-oxidante ou da sua conversão em ião férrico [17]. Desta forma, a quitosana pode estabilizar os lípidos nos alimentos e assim prolongar o seu tempo de prateleira. A quitosana com menor Mm mostrou também uma maior capacidade para quelatar iões ferrosos [17, 31].

### **1.3.5. Aplicações**

A quitosana é uma molécula com um grande potencial para aplicações nas mais variadas áreas, nomeadamente, nas áreas biomédica e alimentar (Tabela 4). As diferentes aplicações dependem das diferentes propriedades da quitosana. Com uma modificação química ou enzimática apropriada, como uma copolimerização ou uma despolimerização controlada, diversas novas aplicações podem surgir, acrescentado valor económico ao material base.



**Tabela 4** – Resumo das aplicações biomédicas, alimentares e outras da quitosana

Área de aplicação	Exemplos
Biomédica	Cicatrização de feridas
	Tratamento de queimaduras
	Substituição da pele
	Libertação controlada de fármacos
Alimentar	Suplemento
	Clarificação de sumos
	Controlo do acastanhamento enzimático
	Agentes de emulsificação
	Filmes e revestimentos
Outras	Purificação de águas residuais
	Composição de cosméticos
	Antimicrobiano oral
	Revestimento de papel
	Processos de separação por cromatografia
	Imobilização de enzimas
	Agricultura
	Indústria têxtil

A quitosana tem inúmeras aplicações biomédicas devido à sua elevada biocompatibilidade. Os oligómeros de quitosana têm demonstrado propriedades de cicatrização de feridas devido à sua capacidade para estimular a produção de fibroblastos, afetando o fator de crescimento dos mesmos. Posteriormente, a produção de colagénio facilita a formação de tecido conectivo [33]. Por outro lado, a quitosana é um promissor candidato para o tratamento de queimaduras, dado que consegue formar filmes biocompatíveis resistentes e com uma excelente permeabilidade ao oxigénio, para além do seu papel enquanto cicatrizante e antimicrobiano. Além disso, os filmes de quitosana têm a capacidade de absorver água e são naturalmente degradados pelas enzimas do corpo, ou seja, não precisam de ser removidos [34].

Uma importante aplicação da quitosana na indústria farmacêutica é o desenvolvimento de sistemas para a libertação controlada de fármacos como as nanopartículas, os hidrogéis, as microesferas e os filmes. É o carácter polimérico catiónico da quitosana e os seus grupos funcionais reativos que conferem a possibilidade da sua utilização na terapia da libertação controlada de fármacos [2].

A quitosana tem sido utilizada em múltiplos suplementos nutricionais devido à sua capacidade para se ligar à gordura, tratando-se, portanto, de um antiolesterolémico. Existem vários mecanismos que foram propostos para a redução do colesterol pela quitosana. Por um lado, a solução viscosa do polissacarídeo causa o aprisionamento da gordura e do colesterol o que leva à redução da sua absorção no organismo. Por outro lado, a presença dos grupos amina na estrutura permite que existam forças electroestáticas entre a quitosana e as substâncias aniónicas, como os ácidos gordos e os ácidos biliares [20].

A aplicação de um filme de quitosana pode controlar o amadurecimento enzimático dos frutos e vegetais, retardando-o, pois inibe a atividade da enzima polifenoloxidase e também inibe parcialmente a peroxidase. Além disso, a quitosana forma uma barreira na superfície dos frutos, o que leva à redução do oxigénio necessário para a oxidação enzimática dos compostos fenólicos [35].

O processo de clarificação dos sumos de fruta envolve geralmente o uso de agentes de clarificação, como a gelatina, taninos, caseinato de potássio entre outros. A quitosana também é um bom agente de clarificação para o sumo de uva e de maçã com ou sem tratamento com pectinases, diminuindo a turbidez do produto final. A quitosana com uma elevada densidade de cargas positivas tem também sido usada para controlar a acidez dos sumos de fruta [20].

A quitosana funciona também como agente de emulsificante, pois produz emulsões água/óleo/água (W/O/W) estáveis sem se adicionar nenhum surfactante, uma vez que é composto por uma mistura de moléculas com diferentes GD. Algumas moléculas menos desacetiladas podem estabilizar as gotas de água dentro das gotas de óleo (W/O), enquanto as moléculas mais hidrofílicas (maior GD) estabilizam as gotas de óleo em água (O/W) [36, 37].

A quitosana tem sido usada com sucesso para a produção de filmes devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Os filmes semipermeáveis de quitosana diminuem as perdas por transpiração, retardam o amadurecimento dos frutos e legumes

(por reduzirem a concentração de etileno e haver uma acumulação de dióxido de carbono) [25] e têm a capacidade de retardar a taxa de transferência de oxigénio, aromas, óleo e solutos [16]. Apesar dos filmes de quitosana serem transparentes e resistentes, têm a desvantagem de serem pouco flexíveis e difíceis de manufaturar [2].

A purificação de águas residuais industriais antes da sua descarga no meio ambiente tem sido uma preocupação ambiental dado que estas águas residuais contêm metais pesados e pesticidas que se podem acumular na cadeia alimentar e provocar problemas para a saúde. Assim, a quitosana pode ser utilizada como uma ferramenta para tratamento da água devido à capacidade dos grupos – NH<sub>2</sub> livres para formar ligações covalentes ou coordenar com iões metálicos, eliminando esses contaminantes das águas [2, 38].

A quitosana tem sido estudada como um revestimento em folhas de papel, devido à sua capacidade em formar filmes fortes e à sua similaridade estrutural com a celulose [16]. Pode também ser utilizada nos processos de separação por cromatografia [34], na imobilização de enzimas pela adsorção ou a fixação por ligações entrecruzadas com a quitosana insolúvel [39].

Na agricultura, a quitosana e os seus derivados podem ser usados como revestimento das sementes, protegendo-as contra o ataque de microrganismos, mesmo a baixas concentrações. A quitosana também se comporta como fertilizante ao acelerar a germinação e o crescimento das plantas [40]. Além disso, a quitosana também tem sido aplicada na produção fibras têxteis para aplicações biomédicas [41].

A quitosana tem sido também utilizada em produtos cosméticos, como por exemplo em champôs e condicionadores, pois devido à sua natureza policatiónica e capacidade formação de géis vão reduzir a repulsão de cargas negativas e aumentar a retenção de água dos cabelos, respetivamente, tornando-os mais suaves [2]. A quitosana pode até ser utilizada em pastilhas elásticas para suprimir o crescimento de bactérias orais [42].

#### **1.4. FILMES À BASE DE QUITOSANA**

Tal como foi anteriormente referido, uma das propriedades com bastante interesse industrial é a capacidade da quitosana em formar filmes. Como a quitosana é biocompatível e não tóxica, estes filmes apresentam a vantagem de poderem estar em contacto com os produtos alimentares. No entanto, os filmes de quitosana apresentam

algumas limitações na sua aplicação, tanto nas suas características mecânicas como em algumas características físico-químicas.

A maior desvantagem da quitosana é a sua solubilidade intrínseca em água, que limita a sua utilização como material de empacotamento. O pH ácido da maior parte dos frutos e legumes pode afetar adversamente as moléculas de quitosana, visto que ela torna-se solúvel em soluções ácidas diluídas [43]. Outra desvantagem é o facto dos filmes de quitosana apresentarem uma elevada permeabilidade ao vapor de água [20], limitando a sua capacidade de criação de um microclima controlado e conduzindo à desidratação do produto [44]. O desempenho mecânico deste filmes geralmente também não é satisfatório para a maioria das aplicações. Apesar de serem resistentes, os filmes de quitosana são normalmente caracterizados pela limitada elongação, o que não é desejável, pois tornam-se pouco flexíveis [2].

As propriedades antioxidantes, de barreira, mecânicas, entre outras, dependem de fatores intrínsecos como a composição do filme, a sua espessura e as técnicas de preparação. Assim, a incorporação de compostos adicionais aos filmes de quitosana podem alterar as suas propriedades [8]. Consequentemente tem havido um crescente interesse em desenvolver filmes à base de quitosana com determinadas modificações químicas para produção de materiais mais funcionais. Métodos desenvolvidos para a modificação química dos filmes à base de quitosana como o *grafting* (ligação de enxertos) e o *crosslinking* (reticulação polimérica) representam vias eficazes para alterar as suas propriedades. No *grafting* ligam-se determinados compostos ao polímero de quitosana de forma a melhorar uma propriedade específica, como por exemplo a ligação de compostos fenólicos ou de nisina para melhorar a capacidade antioxidante ou antimicrobiana [45, 46]. O método de *crosslinking* consiste na utilização de *crosslinkers* (agentes de entrecruzamento), permitindo ligar outros polímeros ao polímero de quitosana ou diferentes cadeias de quitosana entre si. Quando temos cadeias de quitosana extensamente ligadas por *crosslinking*, as suas propriedades são muito diferentes das do polímero inicial. A reticulação do polímero leva à formação de uma rede covalente tridimensional permanente que pode permitir a difusão de água e materiais bioativos e melhorar as propriedades do polímero [6, 47]. Finalmente, também se podem incorporar, sem qualquer modificação química, determinados polímeros como outros polissacarídeos e proteínas ou

óleos com o objetivo de melhorar determinadas propriedades dos filmes à base de quitosana para diversificar a sua aplicação.

#### 1.4.1. Filmes de copolímeros à base de quitosana

Filmes de quitosana com outros polímeros naturais, como as proteínas, os polissacarídeos e os poliésteres, têm sido desenvolvidos de forma a obter copolímeros com características mais vantajosas para determinada aplicação. A comparação entre as propriedades dos diferentes copolímeros é difícil, dado que existem muitas variáveis, nomeadamente, quanto ao grau de desacetilação da quitosana, massa molecular, quantidade e tipo de plastificantes utilizados, espessura dos filmes, condições em que são feitos os vários testes, entre outros. No entanto, na Tabela 5 faz-se um resumo de alguns copolímeros e as suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e antimicrobianas que se encontram descritas na bibliografia.

**Tabela 5** – Filmes à base de quitosana com proteínas, polissacarídeos e poliésteres e as suas propriedades mecânicas, de permeabilidade e antimicrobianas.

Matriz do Filme	Polímero adicionado	Ligação	Concentração	Propriedades mecânicas		PVA (g mm/ m <sup>2</sup> day kPa)	Microrganismo alvo	Ref.
				Força de tensão (FT) (MPa)	E (elongação) (%)			
Quitosana	Amido de banana	Entrecruzamento	0,5:0,5 <sup>a)</sup>	5,2	1,7	41,7	<i>S. aureus</i>	[3]
			1:0,5 <sup>a)</sup>	7,3	1,9	39,2		
			1,5:0,5 <sup>a)</sup>	10,2	1,6	37,5		
			2:0,5 <sup>a)</sup>	14,2	2,6	38,8		
Quitosana	-	-	Controlo	26,0	28,2	15,5	Não foi testado	[47]
	Poli-ε-caprolactona		CH90 <sup>b)</sup>	24,8	28,7	11,6	Não foi testado	[47]
		Miscibilidade e interação (ligações covalentes)	CH80 <sup>c)</sup>	24,7	33,9	11,2		
		Ocorreu separação de fases	CH70 <sup>d)</sup>	16,4	13,2	10,7		

Gelatina	Quitosana	-	Gelatina	-	14,1	5,28	<i>S. aureus</i>	[6]
		-	Quitosana (CH)	-	19,2	5,83		
		Ligações eletroestáticas e pontes de H	Gelatina-CH 1,5% <sup>e)</sup>	-	19,9	3,46		
Quitosana: glucomanana Konjac: isolado de proteína de soja		Pontes de H Electroestáticas	0,375:0,375:0,00 <sup>f)</sup>	51,1	10,7	5,43	Não foi testado	[10]
			0,30:0,30:0,15	43,3	7,2	3,75		
			0,25:0,25:0,25	39,9	4,6	3,49		
			0,15:0,15:0,45	16,8	1,3	4,80		
Quitosana	Proteína do soro do leite		0,8 % w/v de quitosana	-	-	0,4 (g mm m <sup>-2</sup> day <sup>-2</sup> kPa <sup>-2</sup> )	Não foi testado	[25]
			0,8 % w/v de quitosana+2,4 % w/v de soro do leite liofilizado	-	-	1,3(g mm m <sup>-2</sup> day <sup>-2</sup> kPa <sup>-2</sup> )		
Quitosana (2%)	-	-	controlo	23,7	54,6	0,26	Não foi testado	[48]
	Extrato aquoso de chá verde (ECV)	Interações entre a quitosana e os compostos fenólicos dos ECV	5 % ECV	25,1	58,1	0,20		
			10 % ECV	28,4	60,4	0,18		
			20 % ECV	27,5	60,7	0,09		

a) Farinha de banana : quitosana (razão g/100 ml de solução); b) 90 ml de quitosana a 2 % + 10 ml de PCL a 5 %; c) 80 ml de quitosana a 2 % + 20 ml de PCL a 5 %; d) 70 ml de quitosana a 2 % +30 ml de PCL a 5 %; e) Gelatina de bovino + 1.5 % de quitosana em 4 g de gelatina/100 ml água destilada. Foi também adicionado glicerol + sorbitol, cada um com concentração de 0,15g/g do total do polímero; f) O índice de quitosana, KGM e SPI foi representado em g/100 mL, o índice de glicerol foi de 0,003 g/100 mL e o pH da solução foi 3.

Pitak *et al.* [3] testaram as propriedades de filmes de quitosana com farinha de banana (73,4 % de amido) e 0,5 ml de glicerol (plastificante). De uma forma geral, a PVA dos filmes diminuiu com o aumento do conteúdo de farinha de banana. Quando a quantidade de farinha de banana aumenta, tanto a força de tensão como a elongação aumentaram, tal como é pretendido para uma melhor proteção dos produtos alimentares

(Tabela 5). A solubilidade diminuiu de 64,2 % para 40,9 % quando a razão de farinha de banana aumenta de uma razão de 0,5 para 2, o que também é desejável. Estes filmes mostraram ainda atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Nos filmes de quitosana com poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), um poliéster flexível, biodegradável e não tóxico [49, 50], os valores de PVA diminuem com o aumento da quantidade de PCL, devido à natureza hidrofóbica desse polímero [47]. Estes filmes têm valores de força de tensão (FT) da mesma magnitude que os dos filmes de quitosana puros, exceto para o filme CH70, o filme que contém a maior percentagem de PCL incorporada (70 ml de quitosana a 2 % + 30 ml de PCL a 5 %), provavelmente devido à ocorrência de uma separação de fases. A elongação aumentou com o aumento do conteúdo de PCL à exceção novamente do filme em que a quantidade de PCL é superior.

A gelatina e a quitosana podem interagir através de interações eletroestáticas e ligações de hidrogénio para formar um filme com melhores propriedades que as propriedades destes filmes individualmente [6]. Nesta combinação, a solubilidade do filme decresceu em relação à quitosana pura e a elongação aumentou (Tabela 5) principalmente quando comparada com o filme de apenas gelatina, tal como era pretendido. Os filmes resultantes mostraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Jia *et al.* [10] estudaram um filme compósito constituído por quitosana, glucomanana Konjac (GMK) e por isolado de proteína de soja (IPS) em diferentes proporções. Verificou-se que a incorporação de IPS à matriz do polímero de quitosana e GMK diminuiu a PVA, no entanto os valores das propriedades mecânicas também diminuíram, tal como se pode verificar na Tabela 5.

Di Pierro *et al.* [25] desenvolveram filmes de quitosana com proteína do soro do leite para preservação do queijo *Ricotta*, dado que estes filmes podem combinar as propriedades microbianas da quitosana com uma desejável permeabilidade ao vapor de água. A introdução da proteína do soro do leite permitiu baixar a permeabilidade ao oxigénio e ao dióxido de carbono e aumentar a permeabilidade ao vapor de água. Para esta aplicação, o filme deve permitir o movimento de água para prevenir a condensação e, consequentemente, a contaminação microbiológica do queijo.

Dos estudos acima mencionados, nenhum determinou a atividade antioxidante dos filmes, tal como acontece para a maioria dos estudos de filmes à base de quitosana com compostos incorporados. No entanto existem autores que caracterizaram os filmes também

quanto a esta importante característica. Siripatrawan *et al.* [48] verificaram quanto maior a razão de extrato aquoso de chá verde (ECV) nos filmes de quitosana, maior era o índice em compostos fenólicos e consequentemente maior a atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH. A incorporação destes extratos também melhorou as propriedades de barreira e mecânicas.

#### **1.4.2. Filmes à base de quitosana com óleos**

A combinação da quitosana com alguns lípidos pode resultar em filmes com características otimizadas [51]. Os lípidos têm sido incorporados para formar filmes compósitos, principalmente com o objetivo de reduzir a permeabilidade ao vapor de água destes materiais hidrofílicos. Os óleos essenciais são lípidos interessantes para serem incorporados em filmes, dado que estes extratos de plantas também exibem capacidades antioxidantes e atividade antimicrobiana para uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos [52]. A preparação da dispersão para a formação dos filmes necessita da emulsificação da fase oleosa na fase aquosa para permitir a formação do filme. A quitosana tem sido usada para estabilizar as emulsões óleo em água (O/W) de emulsões com óleo de girassol [36] e de dispersões com ácido oleico [53] e óleos essenciais [54] sem a adição de outros surfactantes, tal como está demonstrado na Tabela 6. Tem sido provado que a quitosana fica adsorvida na interface óleo-água, aumentando a estabilidade da emulsão pelo efeito electrostérico, dado que a taxa de floculação diminui [55]. O tamanho das gotas é outro fator determinante para a estabilidade da emulsão e afeta outras propriedades importantes como a viscosidade.



**Tabela 6** – Filmes à base de quitosana com incorporação de óleos e as suas propriedades mecânicas, de permeabilidade e antimicrobianas

Óleo	Ligação	Concentração	Propriedades mecânicas		PVA (g Pa <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> )×10 <sup>11</sup>	Microrganismo alvo	Ref.
			FT (MPa)	E (%)			
Ácido oleico	Ligações estruturais	0,5 Ch(% w/w) <sup>a)</sup>	81	4,6	112	Não foi testado	[53]
		0,5:0,5 (% w/w) <sup>a)</sup>	37	10	64		
Óleo essencial de bergamota (BO)	Pontes de hidrogénio [56]	CH	113	22	124	.	[54]
		CH-1BO	63	5,5	86	<i>Penicillium italicum</i>	
		CH-2BO	50	6	92	<i>Penicillium italicum</i>	
		CH-3BO	22	1,7	65	<i>Penicillium italicum</i>	
Óleo de tomilho (T)	Pontes de hidrogénio [56]	CH	≈85 <sup>b)</sup>	≈7 <sup>b)</sup>	83 <sup>c)</sup>	Não foi testado	[55]
		CH:0,5T	≈48 <sup>b)</sup>	≈36 <sup>b)</sup>	33 <sup>c)</sup>		
		CH:1T	≈23 <sup>b)</sup>	≈31 <sup>b)</sup>	89,6 <sup>c)</sup>		
Óleo de manjerição (M)	Pontes de hidrogénio [56]	CH	≈85 <sup>b)</sup>	≈7 <sup>b)</sup>	83 <sup>c)</sup>	Não foi testado	[55]
		CH:0,5M	≈33 <sup>b)</sup>	≈38 <sup>b)</sup>	42,6 <sup>c)</sup>		
		CH:1M	≈33 <sup>b)</sup>	≈23 <sup>b)</sup>	80 <sup>c)</sup>		
Óleo de tomilho (T)	Pontes de hidrogénio	0 % T	51,2	4,8	-	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i>	[57]
		0,6 % T	31,1	3,2	-		
		1,2 % T	32,9	1,8	-		

a) Homogeneização da dispersão formadora de filmes com um Rotor; b) Valores aproximados (obtidos a partir de um gráfico de barras);

c) Homogeneização da dispersão formadora de filmes por MF.

Bonilla *et al.* [55] caracterizaram as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de quitosana contendo óleos de manjerição e tomilho. Verificaram que o tipo de óleo não afetou significativamente o PVA. No entanto, e com recurso à microfluidização, método de homogeneização que origina emulsões com partículas muito pequenas, verificaram um decréscimo significativo nos valores de PVA na matriz de quitosana

quando a proporção de quitosana:óleo foi de 1:0,5, mas não houve nenhuma alteração significativa em relação à quitosana pura quando esta proporção passou a ser de 1:1 (Tabela 6). Quando a concentração de óleo é baixa, o efeito do aumento geral da natureza hidrofóbica da matriz pode predominar sobre o efeito da perda da coesão da matriz, devido ao elevado grau de contacto entre a quitosana e o óleo que contribuiu para o decréscimo das forças de coesão de toda a rede do polímero, conduzindo ao decréscimo do transporte de vapor de água. No entanto, a elevadas concentrações de óleo, estes efeitos parecem estar equilibrados.

Altiok *et al.* [57] também incorporaram óleo de tomilho em filmes de quitosana, mas também testou a capacidade antimicrobiana e antioxidante dos filmes. Apenas os filmes com 1,2 % de óleo de tomilho (v/v) demonstraram ter capacidade antimicrobiana contra a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de ABTS, os resultados obtidos demonstraram que quanto maior a percentagem de óleo no filme, maior a sua ação antioxidante.

## **1.5. SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA VINÍCOLA: O BAGAÇO DE UVA**

Devido à crescente produção de resíduos, a sua gestão é uma questão cada vez mais pertinente na sociedade atual. O tratamento de resíduos é importante não só para a proteção do ambiente, mas também porque estes podem ser encarados como uma importante fonte de recursos. Esta importância torna-se ainda mais relevante quando um setor tem elevado peso na economia de um país, como é o caso do setor vinícola.

As uvas são das maiores colheitas de frutos, com mais de 60 milhões de toneladas produzidas anualmente a nível mundial, onde cerca de 80 % da colheita é usada na produção do vinho [58], formando grandes quantidades de resíduos. Estima-se que cerca de 13 % do peso das uvas processadas pela indústria vinícola acaba como subproduto [59]. Em Portugal, o setor vinícola é significativo, com uma produção média anual de 7.000.000 hL de vinho, o que corresponde a uma vinificação de 10.000.000 toneladas de uvas por ano [60].

O bagaço é o principal subproduto da indústria vinícola e é o conjunto sólido de massa, separado por prensagem da maior parte do líquido. Este é constituído pelas grainhas, pelas películas e pelos engaços das uvas que ficam retidos no mosto depois do

esmagamento [61]. A sua composição varia consideravelmente dependendo da variedade da uva e principalmente da tecnologia utilizada para fazer o vinho.

O bagaço de uva já tem sido utilizado para diversos fins, como por exemplo para a obtenção de aguardente, etanol, óleo da grainha da uva, tartarato e também para a extração de antocianinas e taninos, para as indústrias enológica e farmacêutica. É ainda usado como adubo para solos e é incorporado em alimentos para animais [62].

O bagaço de uva é constituído principalmente por água (60-70 %) e pela parte sólida. No entanto, é também constituído por [58]:

- lípidos;
- compostos fenólicos, tais como polifenóis e taninos;
- ácido cítrico, tartárico e málico;
- fibras dietéticas;
- etanol.

Yi *et al.* [63] identificaram no bagaço de uva 5 classes de lípidos: lípidos polares, esteróis, ácidos gordos livres, triglicéridos e ésteres de colesterol. Baydar *et al.* [64] determinaram a composição em ácidos gordos de extratos de óleo do bagaço de uva e das grainhas e concluíram que os subprodutos do vinho são uma boa fonte de óleos vegetais comestíveis. O bagaço de uva é constituído por 5,5 a 8,7 % de triacilglicerídeos, dependendo da casta, enquanto as grainhas das uvas contêm 12,4 a 16 %. O ácido gordo mais abundante no bagaço e nas grainhas é o ácido linoleico (Tabela 7).

**Tabela 7 – Ácidos gordos nas grainhas e no bagaço de uva**

	Percentagem de ácidos gordos	
	Grainhas (%)	Bagaço de uva (%)
<b>Ácido palmítico</b>	7,2 - 10,2	8,6 - 10,6
<b>Ácido esteárico</b>	2,9 - 4,6	3,6 - 4,6
<b>Ácido oleico</b>	16,2 - 21,6	16,1 - 22,6
<b>Ácido linoleico</b>	63,3 - 71,4	61,2 - 70,0
<b>Ácido linolénico</b>	0,14 - 0,35	0,47 - 0,63

O elevado conteúdo em polifenóis contribui consideravelmente para a atividade antioxidante do bagaço. As catequinas, epicatequinas, galato de epicatequinas, ácido

benzoico (ácido gálico) [63] e estilbenos [59] são os constituintes mais abundantes e são maioritariamente extraídos das películas e das grainhas das uvas. As propriedades antioxidantes do bagaço dependem da variedade de uva e dos seus constituintes. Estes compostos fenólicos possuem várias propriedades biológicas, como anti-inflamatórias, anticarcinogénicas, antimutagénicas, antimicrobianas e são inibidores da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade [63].

Os compostos extratáveis do bagaço de uva como as pectinas, celulosas, açúcares e os óleos podem também ser utilizados para adicionar a soluções formadoras de filmes de forma a melhorar algumas propriedades destes filmes. Deng *et al.* [65] adicionaram aos extratos do bagaço de uva obtidos com água quente uma pequena quantidade de polissacarídeos, nomeadamente pectinas com baixo grau de metoxilação, e alginato de sódio e mostraram que os filmes resultantes apresentavam uma cor atrativa e propriedades de barreira e mecânicas comparáveis a outros filmes com aplicações alimentares. Além disso, os compostos fenólicos podem também conferir outras propriedades, uma vez, que podem incrementar as atividades antioxidantes e antimicrobianas dos filmes.

## **1.6. ÂMBITO DO TRABALHO**

A quitosana tem comprovadamente propriedades antibacterianas e antioxidantes que são fundamentais para aplicações alimentares, com a vantagem adicional de que a sua utilização conduz à valorização de resíduos muito abundantes, tal como os resíduos das indústrias dos crustáceos. Além disso, a quitosana tem a capacidade de formar filmes resistentes, transparentes e com boas propriedades de barreira ao oxigénio. No entanto, a sua permeabilidade ao vapor de água, a solubilidade em meios ácidos e a flexibilidade não são as mais desejáveis para muitas das aplicações alimentares. Estas propriedades podem ser melhoradas preparando filmes de quitosana misturados com outros compostos ou polímeros.

O bagaço de uva é um subproduto muito produzido em Portugal, pelo que a sua valorização tem um enorme interesse económico. Este resíduo para além de ser constituído por biopolímeros, como polissacarídeos e proteínas, é também constituído por vários tipos de lípidos.

O objetivo deste trabalho consistiu em tornar os filmes de quitosana com os extratos do bagaço de uva incorporados com melhores propriedades antioxidantes e melhores propriedades mecânicas que os filmes constituídos apenas por quitosana. Também se pretendeu diminuir a solubilidade destes filmes de forma a poderem ser utilizados em produtos alimentares ácidos, como a maioria das frutas. Assim, prepararam-se filmes à base de quitosana com do bagaço de uva, nomeadamente com extratos solúveis em água quente, assim como filmes compósitos de quitosana com óleo das grainhas e ceras das películas das uvas de forma a os tornar mais hidrofóbicos. Estes filmes foram, então, caracterizados quanto à sua composição química por FTIR, à sua humidade e solubilidade, capacidade antioxidante, propriedades mecânicas e propriedades antimicrobianas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



## **2.1. EXTRATOS DO BAGAÇO DE UVA**

### **2.1.1. Amostra**

Neste trabalho foi utilizado o bagaço de uva da espécie *Vitis vinifera* (Touriga Nacional) cedida pela Dão Sul no ano 2011. O bagaço de uva esteve conservado a -18 °C cerca de 6 meses até à sua utilização.

### **2.1.2. Extração com água quente**

As películas foram separadas manualmente das grainhas e dos engaços e foram posteriormente secas a cerca de 40 °C por 48 horas. O extrato aquoso foi obtido segundo o método descrito por Deng *et al.* [65], com algumas modificações. As películas secas foram moídas num moinho (Resch, ZM 1000) utilizando uma malha de 0,75 mm. A extração foi realizada com água destilada na razão de 1:10 (m/v) sobre agitação constante, a cerca de 70 °C durante 10 minutos. A mistura foi depois colocada num banho a 50 °C durante 45 minutos para incrementar o rendimento de extração. A mistura foi centrifugada a 15 000 rpm durante 20 minutos por três vezes, filtrou-se sobre vácuo com filtros de papel e liofilizou-se. Foram obtidas duas frações que foram separadas, fração A, com uma tonalidade rosa claro e com uma textura semelhante a um sal e a fração B, com uma tonalidade rosa escura e uma textura elástica. Uma parte das duas frações foram adicionadas e solubilizadas e esta mistura foi dialisada numa membrana de 12-14 kDa de forma a eliminar os sais e depois foi novamente liofilizada, obtendo-se a fração C.

### **2.1.3. Extração do óleo**

As grainhas depois de isoladas foram cuidadosamente lavadas e secas na estufa a 40 °C durante cerca de 18 horas. Posteriormente foram moídas num moinho (Resch, ZM 1000) utilizando uma malha de 0,5 mm. A grainha moída foi colocada num extrator de Soxhlet de 200 mL e foram utilizados 150 mL de *n*-hexano como solvente. O óleo foi extraído em cerca de 30 ciclos de extração durante 5 horas a 80 °C [64]. Após a extração o solvente foi evaporado a pressão reduzida num evaporador rotativo. A extração foi realizada em duplicado.



#### **2.1.4. Extração das ceras**

O resíduo obtido após a extração aquosa das películas das uvas foi utilizado para a extração das ceras. A 26 g de resíduo seco foram adicionados 250 mL de clorofórmio num frasco de vidro Pyrex autoclavável, o frasco foi fechado colocado num banho a cerca de 70 °C durante 30 minutos [66]. Posteriormente filtrou-se a mistura sobre vácuo utilizando filtros de papel. O solvente foi evaporado parcialmente num evaporador rotativo e deixou-se evaporar até à secura à temperatura ambiente.

### **2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS**

#### **2.2.1. Determinação de hidratos de carbono**

##### **2.2.1.1. Método Colorimétrico - Fenol/Ácido Sulfúrico**

O método colorimétrico do fenol/ácido sulfúrico, proposto por Dubois *et al.* [67], foi utilizado neste trabalho para a determinação da concentração de hidratos de carbono nos extratos obtidos com água quente (frações A, B e C).

Este método baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e consequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução para amarelo é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra [68].

A cada tubo de ensaio foram adicionados 100 µL de amostra (com uma concentração entre 0,5 e 2,9 mg/mL dependendo da fração analisada) ou de padrão, para construir a curva de calibração, 1 mL de solução aquosa de fenol a 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A solução foi agitada e deixada a reagir num banho a 100 °C durante 10 minutos. As absorvâncias das amostras e dos padrões foram determinadas a 490 nm (Jenway 6405 UV/Vis). A concentração de hidratos de carbono na amostra foi determinada usando uma curva de calibração com glucose (0 - 1 mg/mL). Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### 2.2.1.2. Análise de Açúcares Neutros

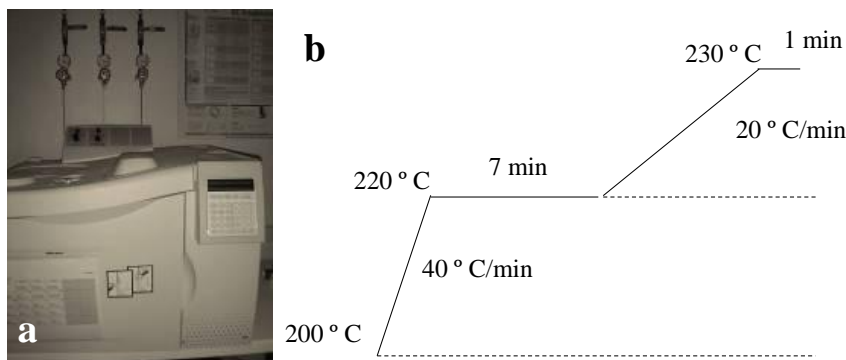
A análise de açúcares neutros foi determinada usando uma adaptação do método de Blakeney *et al.* [69] por Coimbra *et al.* [70].

A 1-2 mg de amostra de extrato de água quente (frações A, B e C) adicionaram-se 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72 % (m/m), tendo-se deixado reagir à temperatura ambiente durante 3 horas com agitação ocasional. No fim deste período de tempo foram adicionados 2,2 mL de água destilada, para se obter uma concentração de 1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a hidrólise ocorreu a 100 °C num bloco de aquecimento durante 2,5 horas. Após 1 hora, os tubos foram colocados num banho de água e foram retirados 0,5 mL de hidrolisado para análise de ácidos urónicos (ponto 2.2.1.3).

Após a hidrólise arrefeceu-se a amostra num banho de gelo e foram adicionados 200 µL de 2-desoxiglucose (1 mg/mL) como padrão interno. Transferiu-se 1 mL do hidrolisado para novos tubos de cultura e neutralizou-se o ácido com 200 µL de amónia (NH<sub>3</sub>) a 25 % e, de seguida, foram adicionados 100 µL de solução de 15 % (m/v) boro-hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) em NH<sub>3</sub> 3 M para a redução dos açúcares a alditóis. Esta solução foi agitada e incubada a 30 °C durante 1 hora. Após arrefecer a solução num banho de gelo, foram adicionados 50 µL de AcOH (2x) para eliminar o excesso de NaBH<sub>4</sub>. Transferiram-se 300 µL desta solução para tubos sovirel e, num banho de gelo, foram adicionados 450 µL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético, agitou-se bem e deixou-se a reagir a 30 °C durante 30 min. Num banho de gelo, foram adicionados 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano para promover a extração dos acetatos de alditol. Após agitação e centrifugação a 3000 rpm durante 30 segundos para a separação das duas fases, a fase aquosa foi aspirada por sucção. À fase orgânica foram adicionados, novamente, 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, centrifugada como descrito anteriormente e a fase aquosa aspirada. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com 3 mL de água, de forma a remover completamente o 1-metilimidazol. A fase orgânica final, onde estão presentes os acetatos de alditol, foi evaporada num evaporador centrífugo e lavada com acetona anidra.

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µL de acetona anidra e 2 µL foram injetados num cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400 (Figura 6 a)) e analisados por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama, GC-FID, usando uma

coluna capilar DB-225 de 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura.



**Figura 6** – (a) Cromatógrafo em fase gasosa (Clarus 400, Perkin Elmer); (b) Programa de temperaturas do GC

A temperatura do injetor era 220 °C e a do detetor era 230 °C. A injeção foi realizada em modo “split”. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial 200 °C, aumento até 220 °C a 40 °C/min, mantendo-se a esta temperatura por 7 minutos, seguido de um aumento até 230 °C a 20 °C/min, ficando a esta temperatura durante 1 minuto Figura 6 b). O gás de arraste foi o hidrogénio (H<sub>2</sub>) com um fluxo 1,7 mL/min e uma pressão de 17 psi.

A análise dos açúcares neutros foi realizada em duplicado. Os açúcares foram identificados pelo tempo de retenção por comparação com padrões.

#### 2.2.1.3. Método Colorimétrico para Determinação de Ácidos Urónicos

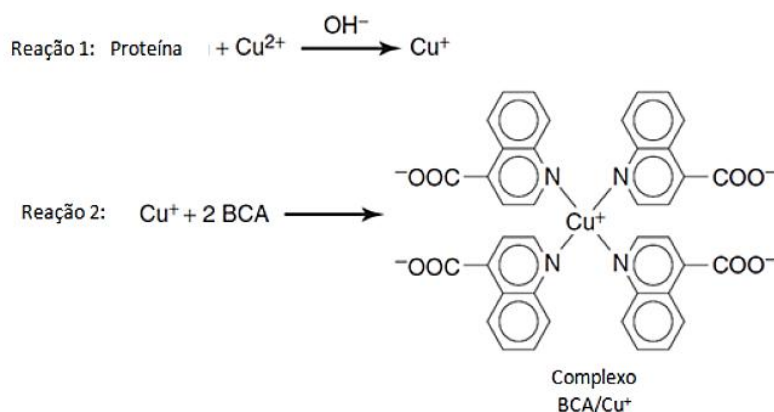
A determinação de ácidos urónicos baseou-se numa adaptação do método desenvolvido por Selvendran *et al.* [71]. As amostras hidrolisadas (500 µL) foram diluídas com 1,5 mL de água destilada. Os padrões para a curva de calibração foram preparados usando uma solução padrão de ácido galacturónico (200 µg/mL).

Foram utilizados 3 tubos para cada amostra ou padrão (1 branco e 2 réplicas) em que se adicionaram 0,5 mL de amostra ou padrão. Os tubos foram colocados num banho de gelo e adicionaram-se 3 mL de ácido bórico 50 mM preparado em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Posteriormente colocaram-se os tubos num banho a 100 °C durante 10 minutos. Arrefeceram-se os tubos e adicionaram-se 100 µL de m-fenilfenol 0,15 % (m/v) em 0,5 % (m/v) NaOH a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão e colocaram-se no escuro a reagir durante 30 minutos. Após este tempo de reação, as soluções foram agitadas de forma a promover uma boa homogeneização da mistura e foram lidas as absorvâncias a 520 nm

(Jenway 6405 UV/Vis). A concentração de ácidos urónicos na amostra foi determinada utilizando a curva de calibração obtida com ácido galacturónico.

### 2.2.2. Determinação da proteína solúvel total pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

Determinou-se a quantidade de proteína total na fração C do extrato com água quente (ponto 2.1.2) pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Este método combina a redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  pelas proteínas em meio alcalino com a elevada sensibilidade e seletividade da deteção colorimétrica do catião de cobre ( $\text{Cu}^+$ ) pela reação com o ácido bicinconínico. O produto da reação apresenta uma cor púrpura e é formado pela ligação de duas moléculas de BCA com o ião  $\text{Cu}^+$  (Figura 7). Este complexo é solúvel em água e absorve a 562 nm [72].



**Figura 7** – Representação esquemática das reações envolvidas no método do ácido bicinconínico para a determinação da proteína solúvel [72].

Num tubo adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 1 mL de ácido bicinconínico e homogeneizou-se a solução. A solução foi incubada a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos e depois deixou-se a arrefecer, em repouso, durante 30 minutos. Após este período foi lida a absorvância a 562 nm (Jenway 6405 UV/Vis). A proteína solúvel presente foi estimada com base numa curva de calibração construída usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão com concentrações entre 0,1 e 0,5 mg/mL. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

### 2.2.3. Determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais presentes no extrato de água quente, nas frações A, B e C (ponto 2.1.2), foram determinados pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, segundo uma adaptação de Huang *et al.* [73]. O reagente de Folin consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, que na presença de certos agentes redutores em meio alcalino, como os compostos fenólicos, formam-se os complexos denominados de molibdénio azul e tungsténio azul, que têm um máximo de absorvância a 760 nm [74].

A 0,125 mL de amostra diluída apropriadamente adicionou-se 0,750 mL de água destilada e 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. A solução foi homogeneizada e deixou-se reagir por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 1 mL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 93 g/L e 1 mL de água destilada. Deixou-se reagir no escuro durante 30 a 90 minutos à temperatura ambiente. Após este período a absorvância foi lida a 760 nm (Jenway 6405 UV/Vis). Os compostos fenólicos totais foram quantificados utilizando uma curva de calibração obtida com ácido gálico (entre 0 a 500 mg/L). Todas as determinações foram efetuadas em triplicado.

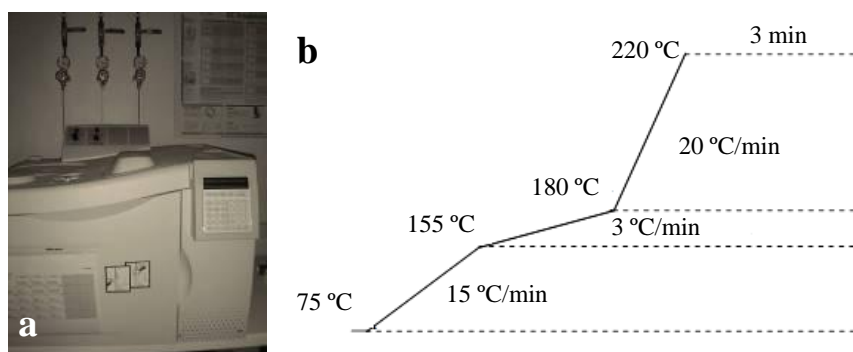
### 2.2.4. Determinação do perfil de triacilglicerídeos

Os FAME (*fatty acids methyl esters* – ésteres metílicos de ácidos gordos) são obtidos por transesterificação dos triacilglicerídeos usando um método simples cuja principal vantagem é o facto de se realizar à temperatura ambiente, reduzindo assim o risco de decomposição dos ácidos gordos [75]. Os FAME, por serem voláteis, podem, então, ser analisados por GC-FID.

Pesou-se rigorosamente uma amostra de óleo da grainha da uva (100 mg) para um tubo de sovirel. A este tubo foram adicionados 5 mL da solução de padrão interno (heptadecanoato de metilo (C:17)) com uma concentração de 0,75 g/L preparado em *n*-hexano. Posteriormente adicionaram-se 0,2 mL de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 2 M preparada em metanol. O tubo foi tapado e agitado vigorosamente durante 30 segundos num vórtex. Seguidamente adicionaram-se 2 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Centrifugou-se a solução anterior a 2000 rpm durante 5 minutos e transferiu-se 1 mL da fase orgânica para outro tubo e adicionou-se 1 mL de *n*-hexano.

Usou-se uma alíquota (1-1,5  $\mu\text{L}$ ) da fase orgânica para análise por cromatografia em fase gasosa (GC).

Os FAME foram separados e quantificados por cromatografia gasosa num cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 400 (Figura 8 (a)) equipado com uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e uma espessura de 0,15  $\mu\text{m}$ ) e com um detetor de ionização por chama. O modo de injeção “split” foi usado com uma razão de 60:1 (5 minutos).



**Figura 8** – (a) Cromatógrafo em fase gasosa (Clarus 400, Perkin Elmer); (b) Programa de temperaturas do GC

A temperatura do injetor era de 245 °C e a do detetor 250 °C. O programa de temperaturas utilizado consistiu num aumento de 75 a 155 °C a 15 °C/min, de 155 a 180 °C a 3 °C/min, e, finalmente, de 180 a 220 °C a 20 °C/min e manteve-se a esta temperatura por 3 minutos (Figura 8 (b)). O gás de arraste foi o hidrogénio ( $\text{H}_2$ ) com um fluxo de 1,7 mL/min. Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com uma mistura comercial de FAME ( $\text{C}_8$ - $\text{C}_{24}$ ). Estas análises foram feitas em duplicado.

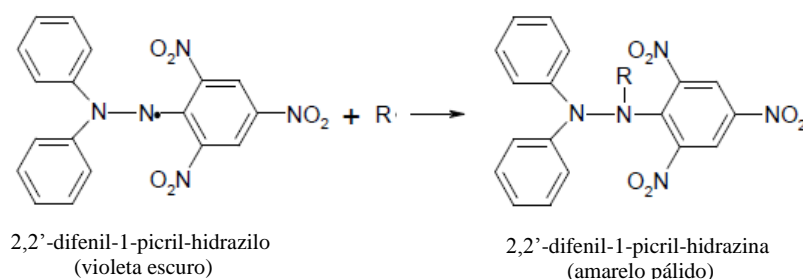
## 2.2.5. Determinação da atividade antioxidante

### 2.2.5.1. ABTS

A atividade antioxidante das três frações de extrato com água quente foi determinada por uma adaptação do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS, descrito por Re et al. [76]. Neste método, o radical monocatiónico de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  é inicialmente gerado por oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), originando um cromóforo azul esverdeado, que depois é reduzido na presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de eletrões (Figura 9). Esta redução provoca uma descoloração que pode ser convertida numa percentagem de inibição do  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  que é proporcional à concentração do antioxidante.



orgânicos, o que é uma limitação para avaliar o comportamento de antioxidantes hidrofílicos.



**Figura 10** – Reação do método de DPPH (adaptado de Huang *et al.* [73])

Soluções padrão de tocoferol em acetato de etilo com concentrações entre 0 e 6 mM foram preparadas para construir a curva de calibração. Alíquotas de 0,05 mL de padrão ou óleo foram adicionadas a 3,95 mL de DPPH<sup>•</sup> 0,15 mM preparado em acetato de etilo. A mistura reacional foi agitada e deixada a reagir à temperatura ambiente no escuro. Depois de 60 minutos, a concentração de DPPH<sup>•</sup> remanescente foi determinada colorimetricamente a 515 nm (Jenway 6405 UV/Vis) [78].

A quantificação da atividade antioxidante foi realizada utilizando uma curva de calibração da percentagem de inibição (equação 2.1) em função da concentração de tocoferol. A atividade antioxidante do óleo extraído foi expressa em equivalentes de tocoferol. As análises foram realizadas em triplicado.

#### 2.2.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) foi realizada com recurso a uma célula de reflexão atenuada total (“attenuated total reflection” – ATR). Esta técnica baseia-se na aplicação da amostra numa superfície de material com índice de refração elevado (por exemplo: um cristal), conhecido como elemento de reflexão interno (IRE) [79, 80]. Esta técnica é utilizada para investigar as vibrações das moléculas e as ligações polares entre os diferentes átomos [81].

Os espectros de FTIR da amostra de extratos do bagaço de uva (extrato de água quente (fração C), óleo e ceras) foram adquiridos com resolução de 16 cm<sup>-1</sup> e 64 scans e num intervalo de número de onda entre 4000-500 cm<sup>-1</sup> num espectrómetro Perkin Elmer, Spectrum BX com acessório Golden Gate. Para cada amostra foi utilizada uma quantidade



suficiente para cobrir o cristal e de seguida a amostra foi pressionada contra o mesmo. Para cada amostra analisada no FTIR foram feitas cinco réplicas.

## 2.3. FILMES À BASE DE QUITOSANA

### 2.3.1. Preparação dos filmes à base de quitosana

Uma solução de quitosana 1,5 % (m/v) (Aldrich, massa molecular média, de acordo com o fabricante) em ácido acético 5 % (v/v) foi preparada por agitação constante, à temperatura ambiente, durante 18 horas. Posteriormente foram adicionados os diferentes extratos obtidos do bagaço de uva, segundo descrito na Tabela 8, e procedeu-se à homogeneização da solução por agitação constante durante cerca de 30 minutos. Foi também preparado um controlo em que não foi adicionado nenhum extrato à solução de quitosana.

**Tabela 8** – Proporção de extratos:quitosana dos vários filmes preparados

Extratos do bagaço de uva	Proporção extrato:quitosana (m:m)
Extrato de água quente (C)	1:10
Ceras	1:10
	1:5
Óleo	1:10
	1:5
	1:2

A esta solução adicionou-se o glicerol, como plastificante, na proporção (1:2) (glicerol:polímero). Esta mistura foi colocada num banho a 50 °C durante 10 minutos, de modo a promover a sua homogeneização. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, filtrou-se a mistura sob vácuo, por um funil de placa porosa (poro G2), tendo-se seguidamente procedido à sua desgaseificação igualmente sob vácuo. Transferiram-se 31 g da solução para placas de acrílico. As placas com a solução foram colocadas niveladas numa estufa a 35 °C com circulação de ar durante 18 horas para formação do filme por evaporação do solvente.

### 2.3.2. Tratamento dos filmes com hidróxido de sódio (NaOH)

Alguns dos filmes preparados, nomeadamente um filme controlo constituído apenas por quitosana, e os filmes enriquecidos em extrato aquoso (fração C) e em ceras, ambos na proporção de 1:10 (extrato: quitosana) foram sujeitos a uma neutralização com hidróxido de sódio (NaOH).

O tratamento com NaOH consistiu em colocar os filmes numa solução com NaOH 1 M durante 1 hora. Decorrido esse tempo, os filmes foram lavados abundantemente com água destilada, para remoção do NaOH, até o pH ser aproximadamente 7. Estes filmes neutralizados foram deixados a secar à temperatura ambiente.

### 2.3.3. Caracterização dos filmes à base de quitosana

#### 2.3.3.1. FTIR

O FTIR foi efetuado a todos os filmes à base de quitosana preparados, tal como foi descrito no ponto 2.2.6.

#### 2.3.3.2. Determinação da humidade

A determinação da humidade dos filmes foi realizada por diferença de massa após secagem. Colocaram-se cápsulas de vidro na estufa durante 5 horas a 105 °C e deixaram-se arrefecer num exsiccador durante cerca de 1 hora. Pesaram-se as cápsulas e em cada uma foi colocado um quadrado de filme (2×2 cm). O conjunto da cápsula e do filme foi colocado na estufa a 105 °C durante 16 horas. Deixaram-se arrefecer até à temperatura ambiente num exsiccador durante 1 hora. Pesou-se cada uma das cápsulas com o filme. A percentagem de humidade foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ humidade} = \left( \frac{m_{\text{filme } i} - m_{\text{filme } f}}{m_{\text{filme } i}} \right) \times 100 \quad 2.2$$

onde  $m_{\text{filme } i}$  é o valor da massa inicial do filme, o  $m_{\text{filme } f}$  é o valor da massa final do filme após retirada a água. A determinação da humidade foi realizada em triplicado.

#### 2.3.3.3. Avaliação da solubilidade dos filmes em água destilada e em solução de matriz de vinho

Os ensaios de solubilidade foram realizados em água destilada com um pH de 6,5 e numa solução matriz de vinho, ou seja, uma solução 10 % etanol com um pH ajustado a 3,5 com ácido clorídrico. Um quadrado de filme com 2×2 cm de área foi pesado e colocado em 30 mL de água destilada e na solução matriz à temperatura ambiente com agitação orbital (80 rpm) durante 7 dias. Findo este tempo, os filmes foram retirados da solução e colocados numa estufa a 105 °C durante 16 horas numa cápsula de vidro. Os filmes foram retirados da estufa e, após arrefecerem à temperatura ambiente num exsiccador durante cerca 1 hora, foram pesados. A solubilidade foi determinada pela percentagem de perda de massa segundo as seguintes equações:

$$m_{\text{filme i seco}} = m_{\text{filme i}} \times \left( 100 - \left( \frac{\% \text{ humidade}}{100} \right) \right) \quad 2.3$$

$$\text{solubilidade} = \left( \frac{m_{\text{filme i seco}} - m_{\text{filme f seco}}}{m_{\text{filme i seco}}} \right) \times 100 \quad 2.4$$

onde  $m_{\text{filme i}}$  é o valor da massa inicial do filme, a  $\% \text{ humidade}$  é o valor determinado no ponto 2.3.2.1 no mesmo dia em que se iniciaram os ensaios de solubilidade,  $m_{\text{filme i seco}}$  é o valor da massa seca inicial do filme e  $m_{\text{filme f seco}}$  é o valor da massa do filme seco após estar mergulhado nas soluções. Os ensaios de solubilidade foram efetuados em triplicado para cada tipo de filme.

#### 2.3.3.4. Determinação da atividade antioxidante dos filmes

A atividade antioxidante dos diferentes filmes à base de quitosana foi determinada pelos métodos de ABTS, DPPH, FRAP e poder redutor.

##### *ABTS*

A atividade antioxidante dos filmes produzidos foi determinada por uma adaptação ao método de ABTS, descrito por Re *et al.* [76].

Preparou-se uma solução de ABTS 7 mM em persulfato de potássio 2,45 mM conforme descrito no ponto 2.2.5.1. Um quadrado de filme com 1 cm<sup>2</sup> foi colocado em 3 mL de solução de ABTS<sup>++</sup> e deixou-se reagir no escuro. A absorvância a 734 nm (Jenway



A solução de  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) foi preparada em água destilada, e a solução de TPTZ 10 mM foi preparada em 40 mM de HCl. O reagente de FRAP foi preparado misturando 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL da solução de cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) com 25 mL de um tampão acetato (0,3 M; pH 3,6) e 3 mL de água. A 3 mL desta solução (FRAP) foi adicionado um quadrado de filme com  $0,25 \text{ cm}^2$  e a absorvância foi lida a 595 nm (Jenway 6405 UV/Vis) ao fim de 60 minutos. A atividade antioxidante dos filmes foi determinada retirando a absorvância do FRAP (sem filme) à absorvância do FRAP com amostra (filme). Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### *Poder redutor*

O método do poder redutor foi realizado segundo o método descrito por Zhang *et al.* [83]. Um quadrado de filme de  $1 \text{ cm}^2$  incubado com 1 mL de ferrocianido de potássio ( $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) 1 % w/v a  $50^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente a reação foi parada por adição de 1 mL de uma solução de ácido tricloroacético 10 % (m/v) e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi misturado com 1 mL de água destilada e 0,2 mL de cloreto de ferro III ( $\text{FeCl}_3$ ) (0,1 % (m/v)). De seguida mediu-se a absorvância a 700 nm (Jenway 6405 UV/Vis). O aumento de absorvância indica o poder redutor dos filmes de quitosana. Os ensaios foram feitos em triplicado.

#### 2.3.3.5. Determinação das propriedades mecânicas

As técnicas mais utilizadas para a caracterização das propriedades mecânicas dos filmes envolvem geralmente ensaios de extensão uniaxial. Como resultado destes ensaios de extensão uniaxial, obtém-se uma curva da tensão em função da taxa de deformação, a partir da qual se podem determinar diversos parâmetros mecânicos:

- a força de tensão ou tensão no ponto de rutura (FT), que indica a força necessária para puxar uma área transversal de um filme até sofrer rutura (geralmente expresso em Pascal (Pa));

- taxa de deformação no ponto de rutura ou alongação no ponto de rutura ( $E$ ) que indica a distância que cada filme pode ser esticado antes de quebrar (expresso em percentagem (%));

- módulo de Young ou módulo de elasticidade que é uma medida de rigidez de um material sólido e é dado pela razão entre a força de tensão e a taxa de deformação na zona

linear da curva força de tensão versus taxa de deformação (expresso em Pascal por percentagem (Pa/%)).

As propriedades mecânicas dos diversos materiais dependem das condições sob as quais os ensaios são realizados, nomeadamente, o tamanho das amostras, pré, acondicionamento, temperatura, humidade relativa, magnitude da força ou deformação aplicadas e velocidade de aplicação.

Os filmes preparados anteriormente foram cortados em amostras retangulares com as dimensões de  $9 \times 1$  cm. Os filmes foram acondicionados numa câmara com uma solução saturada de nitrato de magnésio, sob condições controladas de humidade e temperatura ( $50 \pm 5$  % de humidade relativa e  $22 \pm 5$  °C de temperatura) durante cerca de 48 horas. Após o acondicionamento, procedeu-se a medição da espessura das amostras, utilizando um micrómetro digital (Mitutoyo Corporation) e efetuaram-se os ensaios de tensão até à rutura do filme num texturómetro TA-Hdi (Texture Analyser da Stable Micro Systems).

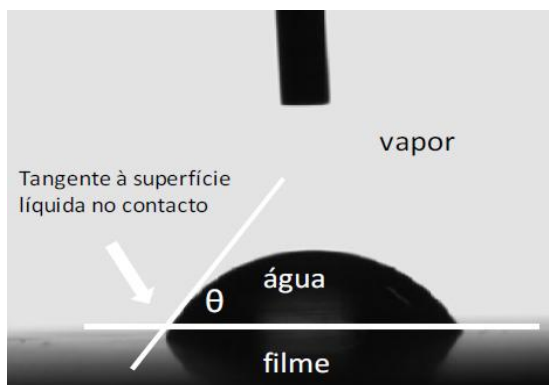
Os filmes foram colocados na vertical entre duas garras revestidas com borracha, deixando cerca de 5 cm de filme exposto. Os ensaios de tensão até à rutura basearam-se no método padrão ASTM D 882-83. Os filmes foram submetidos a uma deformação extensional devido a aplicação de uma taxa de deslocamento de 0,5 mm/s até à rutura da amostra. Através das curvas de tensão *versus* deformação obtidas, calcularam-se os seguintes parâmetros mecânicos: tensões no ponto da rutura, alongamento no ponto da rutura e módulo de Young. Estes ensaios foram realizados a uma temperatura de  $24 \pm 2$  °C e  $40 \pm 5$  % de humidade relativa [84]. Foram analisadas 5 réplicas por cada tipo de filme.

#### 2.3.3.6. Determinação do ângulo de contacto

O ângulo de contacto foi determinado através do sistema de ângulos de contacto OCA 20 da Dataphysics. Como líquido de teste foi utilizada a água ultra pura. Os filmes foram acondicionados numa câmara com uma solução saturada de nitrato de magnésio, sob condições controladas de humidade e temperatura ( $50 \pm 5$  % de humidade relativa e  $22 \pm 5$  °C de temperatura) durante cerca de 48 horas.

Colocou-se uma gota de água de 3 µL, doseada automaticamente por uma seringa, na superfície do filme. A evolução da forma da gota foi gravada com uma câmara associada ao sistema. O cálculo dos ângulos de contacto foi efetuado utilizando um

*software* (dataphysics SCA20\_M4) de análise de imagens segundo o método da elipse. O ângulo de contacto resultante entre o contorno exterior da gota e a superfície do filme é designado por ângulo  $\theta$ , sendo definido como o ângulo entre o plano tangente à gota de água no ponto de contacto de equilíbrio na interface filme/água/vapor e o plano onde está depositada a gota, de acordo com a Figura 12. Os valores finais correspondem a média de 9 determinações (colocaram-se 9 gotas de água ultra pura em diferentes locais do filme).



**Figura 12** – Esquema do ângulo de contacto para uma gota de água molhante sobre superfície do filme [85].

#### 2.3.3.7. Determinação das energias de superfície

As energias de superfície dos diferentes filmes foram também determinadas através do sistema de ângulos de contacto OCA 20 da Dataphysics. Utilizou-se a água ultra pura como solvente polar (3  $\mu\text{L}$ ), a formamida como solvente com uma polaridade intermédia (3  $\mu\text{L}$ ) e, finalmente, o di-iodometano como solvente apolar (1,5  $\mu\text{L}$ ). Os valores das componentes dispersivas e polares destes líquidos, utilizados nas medições do ângulo de contacto, estão disponíveis na literatura e foram introduzidas no programa. A determinação dos ângulos de contacto para cada líquido foi realizada tal como está descrito no ponto anterior (ponto 2.3.3.5). Os valores dos ângulos de contacto foram então usados para determinar as contribuições polares e dispersivas para a energia de superfície das amostras utilizando o método de OWRK (Owens-Wendt Rabel and Kaelble) apropriado para polímeros. Os valores finais correspondem à média de 9 determinações.

#### 2.3.3.8. Propriedades antimicrobianas

Colocaram-se cerca de 0,4 g de pão integral e 2 mL de água em três tubos de cultura. A dois tubos foi adicionado filme de quitosana com uma dimensão de  $2 \times 2$  cm, um filme controlo constituído apenas por quitosana e um filme de quitosana com óleo

incorporado na proporção de 1:2. Ao terceiro tubo não foi adicionado nenhum filme, para servir como controlo (branco). A evolução da estabilidade microbiológica do pão foi macroscopicamente observada ao longo do tempo.

Um sumo de maçã foi preparado por trituração de duas maçãs com uma varinha mágica ao qual se adicionaram 100 mL de água. O sumo de maçã foi obtido por filtração e centrifugação da polpa a 15 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.

A 3 tubos de cultura foram adicionados 5 mL de sumo de maçã. A dois tubos foi adicionado um filme de quitosana com dimensão de  $2 \times 2$  cm, um filme controlo constituído apenas por quitosana e um filme de quitosana com óleo incorporado na proporção de 1:2. Ao terceiro tubo não foi adicionado nenhum filme, para ser usado como controlo (branco). A absorvância foi medida no espectrofotómetro a 640 nm (Jenway 6405 UV/Vis) ao longo do tempo.

## **2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos para a humidade, solubilidade, atividade antioxidante, propriedades mecânicas, ângulos de contacto e energias de superfície foram avaliados estatisticamente. Tal avaliação foi realizada com recurso ao teste f e t-student com um nível de significância de 95 % (ferramentas do Microsoft Excel 2010). As diferenças foram aceites como significativas quando  $p \leq 0,05$ .





### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



### 3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DO BAGAÇO DE UVA

#### 3.1.1. Extrato de água quente

O extrato de água quente, após liofilizado, consistia num material heterogéneo constituído por duas partes visualmente distintas por terem cores e texturas diferentes, a fração A, com uma tonalidade rosa claro e com uma textura semelhante à dos sais (cristais) e a fração B, mais escura que a A e com uma textura mais elástica. Estas frações foram obtidas com um rendimento de extração de 23,8 %. As frações foram caracterizadas separadamente quanto ao conteúdo em hidratos de carbono e compostos fenólicos e a sua capacidade antioxidante foi também determinada. Verificou-se que a fração A era constituída por 4,4 % de hidratos de carbono totais, determinados pelo método colorimétrico, e por 0,6 % de compostos fenólicos e a fração B era constituída por 20,6 % de hidratos de carbono e 3,5 % de compostos fenólicos (Tabela 9). No caso da fração A, a quantificação total dos compostos determinados (hidratos de carbono e compostos fenólicos) foi muito inferior, apenas correspondia a 5 %, em relação à fração B, cerca de 25 %. Este resultado indicia que o extrato A poderia ser constituído por uma elevada quantidade de sais. De facto, pela bibliografia, sabe-se que o bagaço de uva contém diversos sais, nomeadamente sais de sódio e potássio dos ácidos tartárico e málico [86].

**Tabela 9** – Caracterização química dos extratos obtidos com água quente a partir do bagaço de uva.

Fração	Rendimento em massa %	Hidratos de carbono totais % (Dubois)	Proteína % (m/m)	Compostos fenólicos % (m/m)	Atividade antioxidante (mg/L de equivalentes de trolox)
A	23,8	4,4 ± 0,2	n.d	0,6 ± 0,01	3,3 ± 0,6
B		20,6 ± 0,6	n.d	3,5 ± 0,04	25,6 ± 0,5
C	0,9	62,6 ± 3,98	21,5 ± 0,8	5,7 ± 0,06	41,8 ± 8,5

n.d- não determinado

Uma vez que a presença de sal não permite formar filmes de quitosana homogéneos, foi, então, realizada uma diálise à mistura dos extratos A e B para retirar os sais, obtendo-se a fração C.

O rendimento da fração C foi de apenas 0,9 % em relação à massa seca das películas e era constituída por 62,6 % de hidratos de carbono, determinados colorimetricamente (Tabela 9). Esta fração era também constituída por 21,5 % de proteína. Segundo González-Centeno *et al.* [87] o bagaço de uva é constituído por 5,6 a 11,5 % de proteína, dependendo das castas estudadas. Como o extrato C foi extraído com água quente, os compostos de natureza hidrofílica estão mais concentrados neste extrato que no bagaço de uva, por isso a quantidade de proteína pode ser superior. A constituição em compostos fenólicos totais desta fração foi de 5,7 %. O bagaço de uva pode conter diferentes tipos de compostos fenólicos, tais como antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos, catequinas, flavonóis e estilbenos. Têm sido feitos inúmeros estudos acerca dos efeitos antioxidantes destes metabolitos secundários das plantas, revelando que inibem a oxidação das lipoproteínas humanas de baixa densidade. O índice de compostos fenólicos totais está geralmente correlacionado com a capacidade antioxidante deste subproduto [88, 89]. Tal como se pode verificar na Tabela 9, quanto maior a percentagem em compostos fenólicos totais, maior é a capacidade antioxidante do extrato, com a fração C a ter uma atividade antioxidante superior, de 42 mg/L de equivalentes de trolox. A soma das percentagens obtidas na fração C para os diferentes tipos de compostos (hidratos de carbono, proteínas e compostos fenólicos) foi de 99,7 %, o que permitiu ter uma caracterização aparentemente completa deste extrato.

A composição em monossacarídeos das três frações foi também determinada, estando os resultados apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** – Composição em monossacarídeos (mol %) dos extratos do bagaço de uva obtidos com água quente.

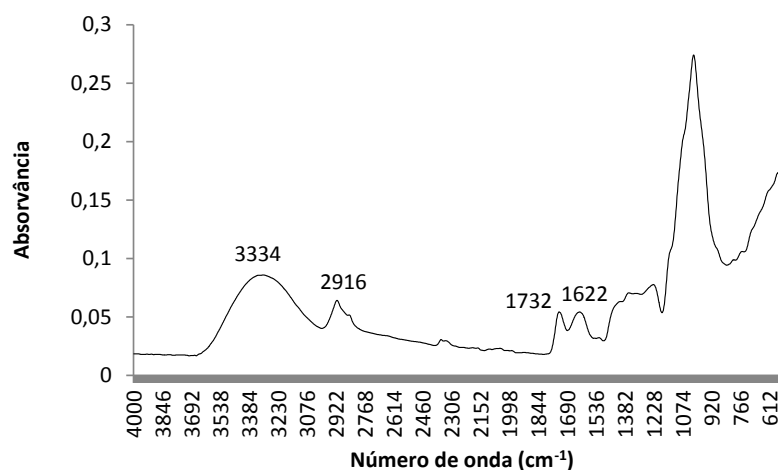
Fração	Hidratos de carbono totais % (Açúcares neutros + Ác. Urónicos)	Hidratos de carbono (mol %)							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Ur.
A	3,7 ± 0,2	v	2	19	3	2	1	22	50
B	21,6 ± 3,9	v	v	14	4	8	7	42	23
C	72,5 ± 2,5	4	v	28	3	5	13	12	34

v- vestigial

Tal como já se tinha verificado pelo método colorimétrico (Tabela 9), a fração A era apenas constituída por cerca de 4 % de açúcares totais, maioritariamente por ácidos urónicos (50 %) e por glucose (22 %) e arabinose (19 %). O açúcar maioritário da fração B foi a glucose (42 %), seguido dos ácidos urónicos (23 %) e da arabinose (14 %). Esta fração era muito mais rica em açúcares totais que a fração A, cerca de 22 %. A fração C era constituída por 63 % de hidratos de carbono segundo o método colorimétrico (Tabela 9) e por 73 % segundo a determinação dos monossacarídeos (Tabela 10). Esta fração era constituída maioritariamente por ácidos urónicos (34 %), arabinose (28 %), glucose (12 %) e galactose (13 %). A presença destes açúcares sugere a presença de polissacarídeos pécnicos, nomeadamente de ramnogalacturonanas do tipo I, que estão ramificadas com cadeias de arabinanas e arabinogalactanas [90, 91]. Algumas proteínas também poderão estar, eventualmente, ligadas a algumas arabinogalactanas, formando as chamadas proteína-arabinogalactanas (AGPs) [92]. A percentagem de glucose diminuiu consideravelmente da fração A (22 %) e B (42 %) para a fração C (12 %) o que mostra que a glucose presente era maioritariamente de baixo peso molecular, possivelmente devido a açúcares não fermentados durante o processo de vinificação [87]. A glucose pode estar ainda presente neste extrato devido à sua adsorção ao material polimérico do extrato [93] e/ou devido à presença de compostos fenólicos glucosilados.

#### 3.1.1.1. FTIR

A Figura 13 representa o espectro de absorvância do extrato C na zona do infravermelho médio (500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Neste espectro observa-se uma banda larga com um máximo observado a 3334  $\text{cm}^{-1}$  existentes nas estruturas dos monossacarídeos e ao estiramento (“stretching”) das ligações N-H da amida A das proteínas. O estiramento assimétrico do grupo  $\text{CH}_2$  dos polissacarídeos é observado a 2916  $\text{cm}^{-1}$  [94, 95]. O pico observado a 1732  $\text{cm}^{-1}$  e corresponde à vibração por estiramento dos grupos carbonilo ( $\text{C=O}$ ) presentes nos ácidos urónicos presentes nos hidratos de carbono deste extrato. O pico a 1622  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação  $\text{C=O}$  da ligação peptídica das amidas I das proteínas [96]. Na região de *fingerprint* ( $< 1400 \text{ cm}^{-1}$ ) existem perfis complexos de absorção. As bandas observadas no intervalo de 1184 a 792  $\text{cm}^{-1}$  são devido às cadeias de polissacarídeos, incluindo ligações glicosídicas, e estiramento das ligações de C-O e C-O-C [95]. A análise do espectro de FTIR confirma a constituição deste extrato em polissacarídeos e proteínas.



**Figura 13** – Espectro de FTIR do extrato C.

### 3.1.2. Óleo da grainha

O rendimento de extração do óleo das grainhas das uvas foi de 16,7 % (m/m). Tal como se pode verificar na Tabela 11, o ácido gordo predominante é o ácido linoleico (70 %), seguido do ácido oleico (18 %), palmítico (7 %) e esteárico (5 %). Estes resultados estão de acordo com a literatura, em que a óleo da grainha está descrito como sendo constituído por 63 a 71 % de ácido linoleico, 16 a 22 % de ácido oleico, 7 a 10 % de ácido palmítico e por 3 a 5 % de ácido esteárico [64].

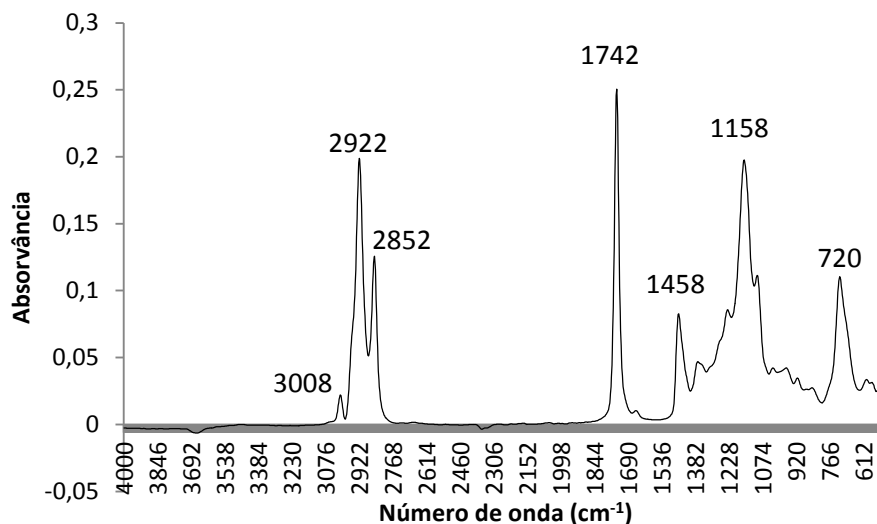
**Tabela 11** – Composição do óleo das grainhas das uvas em ácidos gordos.

Ácido gordo	% Ác. Gordo no óleo
Palmítico (C16:0)	7,31 ± 0,17
Linoleico (C18:2)	69,91 ± 0,19
Oleico (C18:1)	17,61 ± 0,03
Esteárico (C18:0)	5,17 ± 0,01

A capacidade antioxidante do óleo foi determinada pelo método de DPPH, sendo de 0,24 mM de equivalentes de tocoferol/mL de óleo. O óleo contém elevados índices de tocoferol (vitamina E), que devido à sua capacidade antioxidante, tem importantes efeitos na saúde humana, pois protege os tecidos de reações de peroxidação. Embora a grainha da uva seja rica em compostos fenólicos, nomeadamente proantocianidinas, antioxidantes naturais com elevada atividade antirradicalar, a quantidade destes compostos que são

extraídos com o óleo são muito baixas devido à natureza polar das suas estruturas químicas [97]. Assim, a capacidade antioxidante do óleo é principalmente devido à presença do tocoferol.

A análise do espectro de FTIR do óleo extraídos das grainhas do bagaço de uva (Figura 14) mostra um pico a  $3008\text{ cm}^{-1}$ , corresponde ao estiramento (“stretching”) das ligações duplas *cis* da ligação  $=\text{C}-\text{H}$ . Comprova-se, portanto, que existem insaturações nos ácidos gordos do óleo. As bandas com máximos de absorção a  $2922$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de estiramento antissimétricas e simétricas, respetivamente, das ligações alifáticas  $\text{C}-\text{H}$  em grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (alcanos). O pico intenso a  $1742\text{ cm}^{-1}$  representa a vibração por estiramento dos grupos carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ) dos triacilglicerídeos. Na região do *fingerprint* ( $< 1400\text{ cm}^{-1}$ ) existem perfis complexos de absorção. As bandas observadas entre  $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  são maioritariamente atribuídas às vibrações “bending” dos grupos alifáticos de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e a banda a  $1458\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação de dobramento angular (“scissoring”). A banda situada a  $1158\text{ cm}^{-1}$  corresponde às ligações de estiramento dos grupos  $-\text{C}-\text{O}$  (éster). Finalmente, a banda a  $720\text{ cm}^{-1}$  é devido à sobreposição de vibrações de rotação (“rocking”) em  $-(\text{CH}_2)_n-$  e de vibrações fora do plano (“out-of-plane”) de  $-\text{HC}=\text{CH}-$  (*cis*) [98]. Desta forma, o espectro de FTIR obtido está de acordo os espectros de FTIR típicos de óleos.

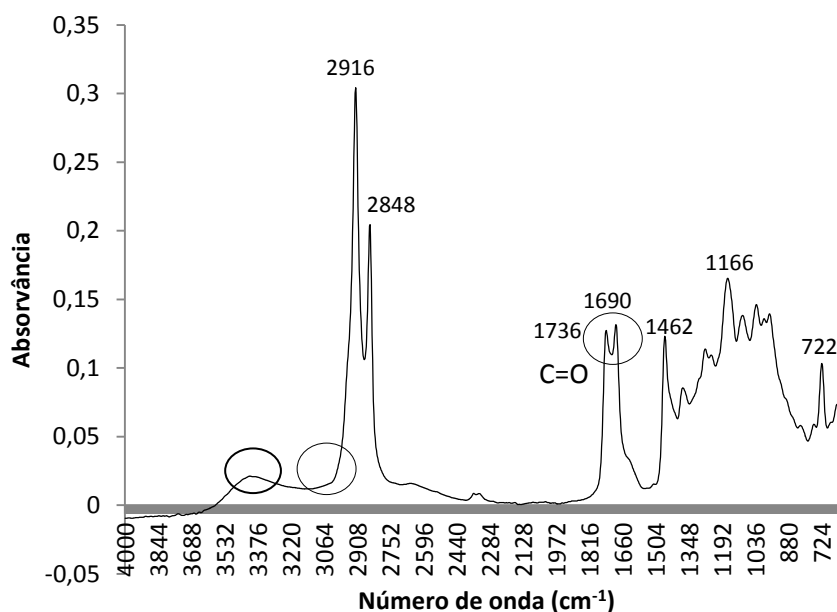


**Figura 14** – Espectro de FTIR ao óleo das grainhas das uvas.



### 3.1.3. Ceras

O resíduo obtido após a extração aquosa das películas das uvas foi utilizado para a extração das ceras. Utilizou-se um ensaio preliminar para averiguar qual o melhor solvente orgânico, o clorofórmio ou o éter de petróleo, a utilizar na extração. O que obteve um melhor rendimento foi o clorofórmio, cerca de 6,5 %. As ceras obtidas foram caracterizadas por FTIR, tal como se pode ver na Figura 15.



**Figura 15** – Espetro de FTIR às ceras das películas das uvas.

O espectro FTIR das ceras apresenta um perfil idêntico ao dos óleos. No entanto foram observadas algumas diferenças, a primeira deve-se à presença de uma banda larga com um máximo observado a  $3412\text{ cm}^{-1}$ , correspondente às ligações O-H presentes nos álcoois das ceras e nos ácidos gordos que se encontram hidroxilados. A segunda diferença deve-se ao facto de não haver nenhum pico na zona de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde às ligações  $\text{=C-H}$ , ou seja, não foram encontradas insaturações nas ceras, o que não significa que elas não estejam presentes. Os picos que se encontram a  $1736$  e  $1690\text{ cm}^{-1}$  são referentes à frequência de estiramento dos grupos carbonilo ( $\text{-C=O}$ ) característicos de ésteres e de ácidos gordos livres, respetivamente, ou seja, segundo os resultados obtidos, ao contrário dos óleos, as ceras contêm ácidos gordos livres. A zona do *fingerprint* das ceras é mais complexa e com picos menos evidenciados do que os existentes nos óleos. No

entanto, a análise que foi feita dos óleos nesta região pode também ser aplicada para este caso [98].

Segundo a bibliografia, as ceras são maioritariamente constituídas por álcoois, ácidos gordos e cerca de 30 % de ácido oleanóico, um triterpeno pentacíclico (C<sub>30</sub>). O ácido oleanóico existe na forma livre, ligada a açúcares ou esterificada com diferentes ácidos gordos e podem ser encontrados nas uvas [66]. Os bagos das uvas não fermentam apesar da existência de leveduras de fermentação nas suas películas. Tal deve-se à proteção física da película e pela possível proteção química do ácido oleanóico que atua como tóxico celular, inibindo a ação de microrganismos [99].

### 3.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA

Os diferentes extratos obtidos a partir do bagaço foram utilizados para produzir filmes à base de quitosana. Numa primeira fase produziram-se filmes enriquecidos com extrato aquoso, constituído maioritariamente por polissacarídeos (fração C), numa proporção de 1:10 de extrato:quitosana (**polissac. 1:10**), filmes enriquecidos com ceras numa proporção também de 1:10 (**ceras 1:10**) e filmes à base de quitosana com uma proporção de óleo de 1:10 e de 1:5 (**óleo 1:10** e **óleo 1:5**). Um filme constituído apenas por quitosana foi também produzido para servir como controlo (**controlo**).

O extrato aquoso rico em polissacarídeos, quando foi adicionado à solução de quitosana, não se solubilizou completamente mesmo após um longo período de homogeneização. O passo da filtração por vácuo permitiu remover o extrato não solubilizado, ficando a solução homogénea e, conseqüentemente, os filmes também ficaram. No entanto, a quantidade de extrato presente no filme foi inferior ao pretendido inicialmente. Com a adição de óleo e ceras às soluções de quitosana, as propriedades anfífilas da quitosana, que lhe conferem natureza emulsificante, permitiram estabilizar as gotas de óleo e de ceras nas emulsões formadoras de filmes e, deste modo, obtiveram-se filmes finos, homogéneos e mais opacos que os filmes controlo e com polissacarídeos. Além disso, todos os filmes foram facilmente removidos das placas de acrílico e mostraram superfícies regulares.

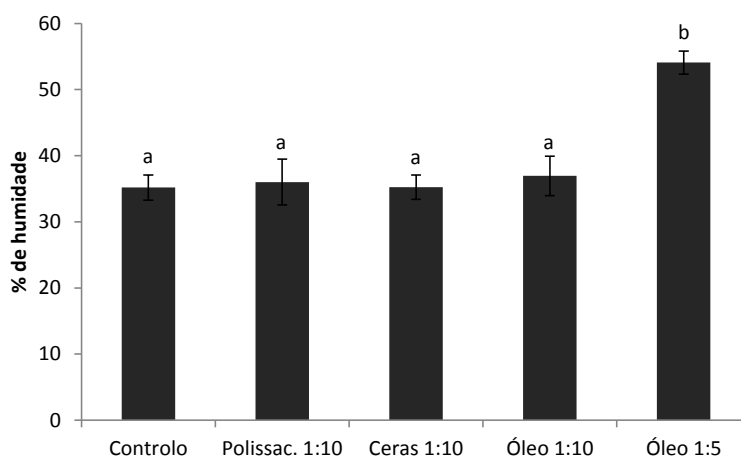
A todos os filmes desenvolvidos foi adicionado um plastificante, na proporção de 1:2 de plastificante:polímero, ou seja, 0,75 % (m/v) de glicerol. Esta molécula de baixo

peso molecular reduz a fragilidade dos filmes por interferir nas ligações inter e intramoleculares de pontes de hidrogénio, tornando-os mais flexíveis e fáceis de manusear.

Todos os filmes produzidos nesta primeira fase (**polissac. 1:10; ceras 1:10; óleo 1:10; óleo 1:5 e controlo**) foram caracterizados quanto à sua humidade, solubilidade e propriedades antioxidantes.

### 3.2.1. Humidade e solubilidade

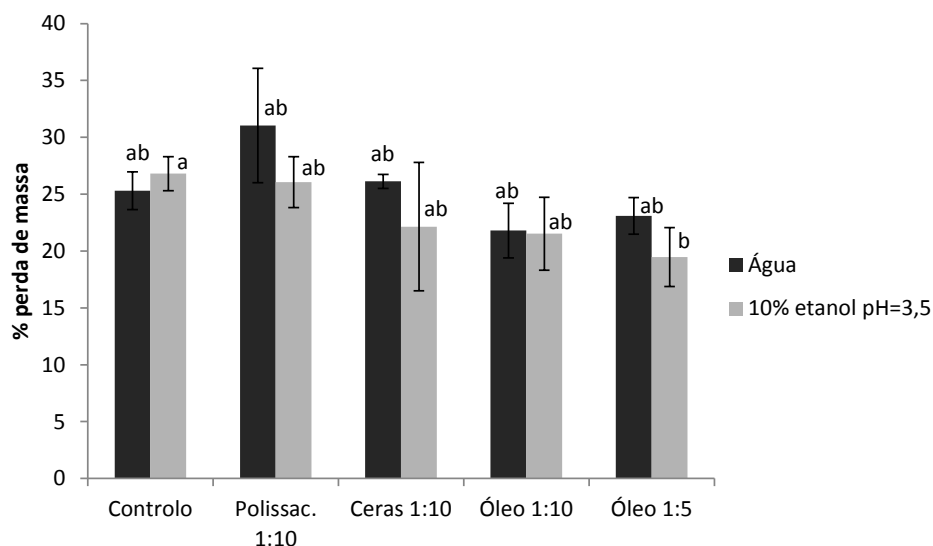
A percentagem de humidade de todos os filmes à base de quitosana é apresentada na Figura 16. Verificou-se que todos os filmes possuíam aproximadamente a mesma percentagem de humidade, cerca de 35 %, à exceção do filme enriquecido em óleo na proporção 1:5 que apresentava uma percentagem de humidade significativamente superior (54 %). O filme com óleo 1:5 é o filme à base de quitosana enriquecido numa maior percentagem de extrato hidrofóbico, mostrando que a maior quantidade de material hidrofóbico em contacto com a quitosana dificulta a evaporação durante a formação do filme.



**Figura 16** – Percentagem de humidade do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

A solubilidade dos filmes em água destilada com pH = 6,5 e também numa solução matriz de vinho (pH = 3,5 com 10 % etanol) foi testada durante 7 dias pois uma possível aplicação destes filmes à base quitosana, que tem sido desenvolvida na Universidade de Aveiro [85, 100], é a sua utilização como substituto de anidrido sulfuroso que é usado na vinificação como antissético e antioxidante [101].

Na Figura 17 estão representadas as solubilidades, ou seja, a percentagem de perda de massa, tanto em água destilada como na matriz de vinho, dos diferentes filmes à base de quitosana. Tal como se pode observar, não existem diferenças significativas para os valores de solubilidade dos diferentes filmes tanto em água destilada como na solução hidro-alcoólica ácida, à exceção do filme de óleo 1:5 em relação ao filme controlo na solução hidro-alcoólica ácida, em que se verificou uma diminuição significativa de cerca de 28 %.



**Figura 17** – Solubilidade (% perda de massa) do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5) em água e numa solução ácida (pH 3,5) com 10 % de etanol. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

O filme mais hidrofóbico (óleo 1:5) foi o que teve um comportamento na solubilidade diferente em relação aos restantes filmes, tal como se tinha verificado em termos de humidade. O facto de ser mais hidrofóbico pode ter reduzido o acesso da solução às cadeias de quitosana, ou seja, diminuiu a permeabilidade deste filme, o que conduziu à diminuição da sua solubilidade. Estes resultados estão de acordo com o verificado por Hosseini *et al.* [102], que incorporaram óleo de tomilho em filmes de base de quitosana e verificaram que a diminuição da solubilidade dos filmes estava relacionada com o aumento da hidrofobicidade das suas superfícies.

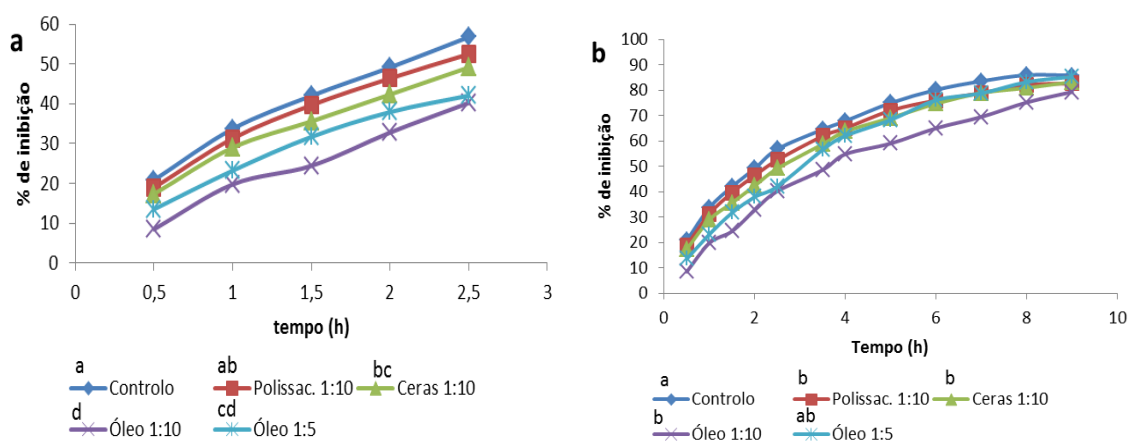
### 3.2.2. Atividade antioxidante

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para determinar a atividade antioxidante, baseados em diferentes mecanismos de ação: captura de radicais peróxido; poder de redução de metais; captura de radicais hidroxilo; captura de radicais orgânicos e quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lípidos [103].

A atividade antioxidante foi determinada para todos os filmes preparados utilizando os métodos: ABTS (preparado em água e em etanol), DPPH, FRAP e poder redutor. Dos métodos usados, o ABTS e o DPPH, avaliam a capacidade de captura de radicais orgânicos e os outros dois, o FRAP e o poder redutor, avaliam o poder de redução do ferro.

### 3.2.2.1. Método de ABTS preparado em água

Na Figura 18 está representada a percentagem de inibição da oxidação obtida pelo método de ABTS para os diversos filmes produzidos ao longo do tempo utilizando como solvente água destilada.



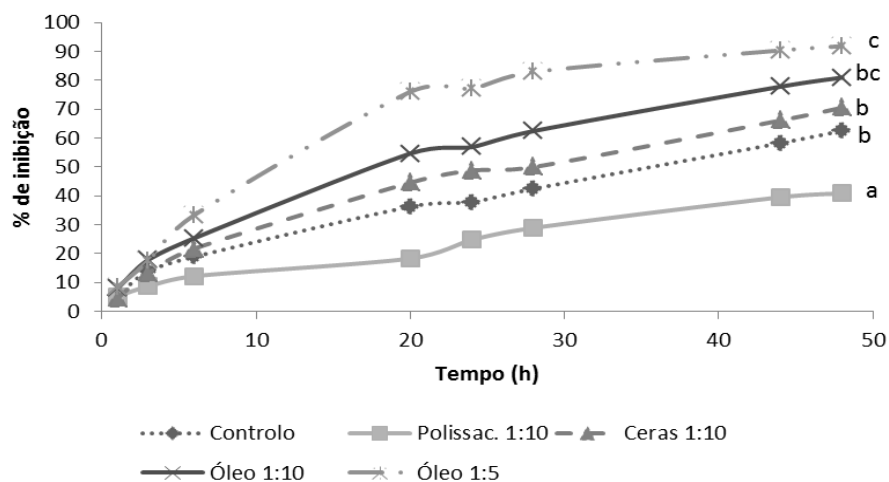
**Figura 18** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controle) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de ABTS em água, ao longo do tempo: (a) até 2,5 h e (b) até 10 h de reação. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

A Figura 18a mostra que os filmes controlo e enriquecidos em polissacarídeos são os que apresentaram a maior percentagem de inibição, com 57 e 52 %, respetivamente, após 2,5 horas de reação com ABTS, logo maior atividade antioxidante, e não têm diferenças significativas entre si. Por outro lado, os filmes enriquecidos em óleo foram os que apresentaram menor atividade antioxidante, com cerca de 40 % de inibição, ou seja, cerca de 30 % inferior em relação ao filme controlo. O filme preparado com as ceras não apresentou diferenças significativas na percentagem de inibição em relação aos filmes de polissacarídeos e também em relação ao filme preparado com óleo 1:5, sendo a sua percentagem de inibição de 49 %. Após 10 horas de reação verificou-se que todos os filmes atingiram uma percentagem de inibição entre 82 a 88 %. No entanto, ainda se

verificaram algumas diferenças significativas entre os filmes, nomeadamente para o controlo, que apresentou a percentagem de inibição superior (Figura 18b).

### 3.2.2.2. Método de ABTS preparado em etanol

Na Figura 19 está representada a percentagem de inibição da oxidação obtida para os diversos filmes produzidos pelo método de ABTS ao longo do tempo utilizando como solvente o etanol.



**Figura 19** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de ABTS em etanol ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

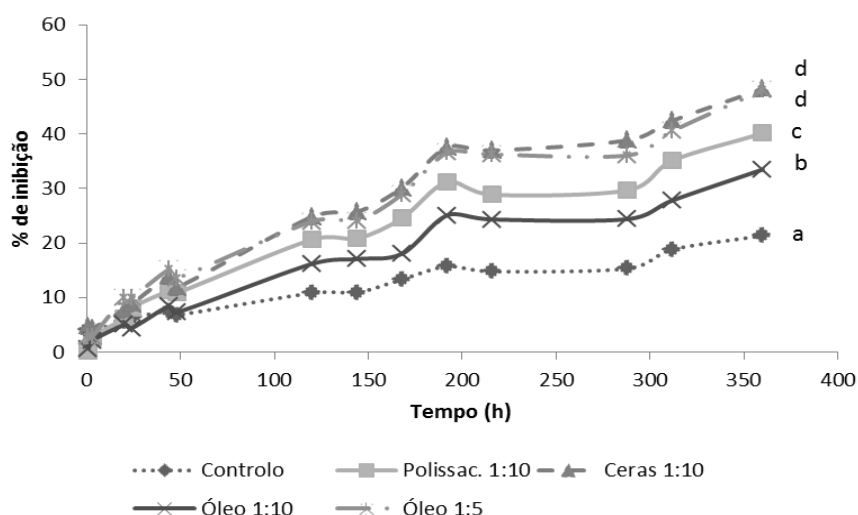
No método de ABTS com etanol, o filme produzido com óleo 1:5 foi o que demonstrou ter a maior atividade antioxidante, com uma percentagem de inibição de 92 % após 48 horas de reação, significativamente superior aos filmes produzidos com ceras (30 % superior), ao controlo (47 % superior) e também em relação ao com polissacarídeos (125 % superior). Os filmes óleo 1:10, ceras 1:10 e controlo não demonstraram ter diferenças significativas entre si, tendo uma atividade antioxidante significativamente superior que o filme enriquecido em polissacarídeos, que apenas apresentou uma percentagem de inibição de 41 % após as 48 horas de reação. No filme com óleo 1:5 praticamente todos os radicais de  $ABTS^{+}$  foram reduzidos ao fim de 48 horas, enquanto para os restantes filmes, a percentagem de inibição poderia continuar a aumentar ao longo do tempo, pois ainda havia radicais em solução.

Comparando o método de ABTS em água e em etanol, pode-se verificar que em água a cinética da reação é muito mais rápida relativamente ao etanol, pois enquanto em

água deixou de haver radicais em solução logo após 10 horas de reação, usando o etanol continuaram a existir radicais mesmo após 48 horas. Por outro lado, também se pode verificar que enquanto em água os filmes controlo e com polissacarídeos (após 2,5 horas), ou seja os filmes mais hidrofílicos, são os que têm maior percentagem de inibição, em etanol são os filmes enriquecidos em óleo, ou seja, os mais hidrofóbicos, os que apresentaram maior percentagem de inibição.

### 3.2.2.3. Método de DPPH

A atividade antioxidante foi também determinada pelo método de DPPH. Este método, à semelhança do método de ABTS, baseia-se também na capacidade dos filmes em capturar radicais livres. Como o DPPH não se solubiliza em meio aquoso, foi utilizado etanol como solvente. Na Figura 20 está representada a resposta antioxidante dos diferentes filmes utilizando este método.



**Figura 20** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de DPPH, ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

Os filmes com ceras e com óleo na proporção de 1:5 foram os que obtiveram maior percentagem de inibição (48 %), ou seja, apresentaram uma percentagem 2,3 vezes superior ao filme controlo, que foi o filme que apresentou a menor percentagem de inibição (21 %) após 360 horas de reação. O filme enriquecido em polissacarídeos obteve uma percentagem de inibição 88 % superior ao controlo e o filme com óleo incorporado na proporção de 1:10 apresentou uma atividade antioxidante 57 % superior. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Moradi *et al.* [104], que incorporaram óleo essencial de

*Zataria multiflora* Boiss, uma planta aromática medicinal asiática, em filmes de quitosana e verificaram que o aumento da concentração deste óleo essencial nos filmes conduziu a um aumento da sua capacidade antioxidante. Por outro lado, Siripatrawan *et al.* [48] incorporaram extrato aquoso de chá verde em filmes de quitosana e verificaram que quanto maior a percentagem de extrato nestes filmes, maior a sua capacidade antioxidante pelo método de DPPH. Segundo os autores, este incremento da ação antioxidante dos filmes deveu-se ao aumento do índice de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso.

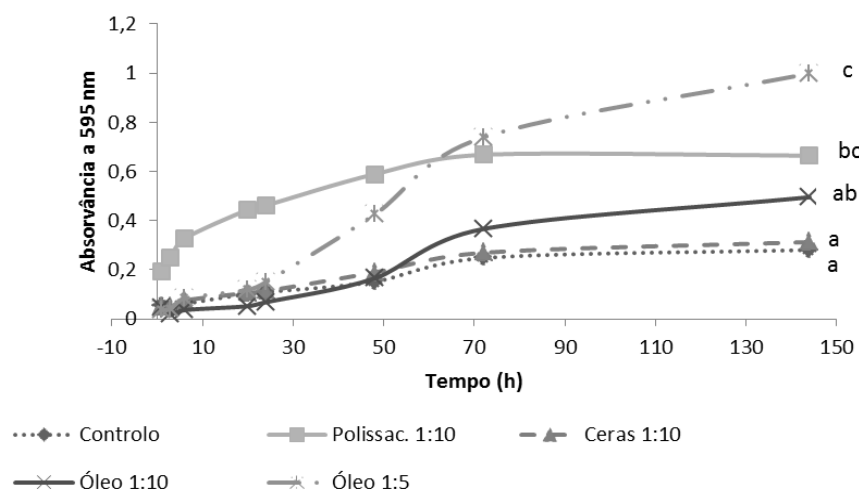
Os resultados obtidos mostram que a velocidade de redução dos radicais de DPPH foi ainda mais lenta do que a dos radicais de ABTS em etanol, pois só após 360 horas é que o filme com óleo 1:5 atingiu 48 % de inibição, enquanto com o ABTS preparado em etanol, o mesmo filme atingiu 92 % de inibição logo após 48 horas de reação.

Tal como foi referido para o método de ABTS em etanol, utilizando o método de DPPH também se verificou que os filmes à base de quitosana enriquecidos em extratos mais hidrofóbicos, ou seja, enriquecidos em óleo (1:5) e ceras (1:10), são os que apresentaram maior percentagem de inibição, quando comparados com o filme controlo apenas constituído por quitosana. De uma forma geral, também se pode constatar que, para o caso do óleo, quanto maior a proporção de extrato maior a percentagem de inibição, isto é, maior a atividade antioxidante dos filmes.

#### 3.2.2.4. Método de FRAP

Outro método utilizado para determinar a atividade antioxidante dos filmes foi o método do FRAP. Este método, ao contrário do ABTS e DPPH, não se baseia na capacidade dos filmes em capturar radicais livres, mas sim na capacidade dos filmes em se oxidarem na presença de um oxidante forte, o  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2\text{Cl}_3$ , evitando deste modo a oxidação de outros compostos. Na Figura 21 está representado o comportamento antioxidante dos diversos filmes preparados utilizando o FRAP.





**Figura 21** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controle) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método de FRAP, ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

O filme enriquecido em polissacarídeos demonstrou maior atividade antioxidante, pelo menos até às 50 horas de reação, em relação a todos os outros filmes. A partir deste tempo, pode-se constatar que a atividade antioxidante deste filme estabilizou, enquanto o filme enriquecido em óleo numa proporção de 1:5 continuou a reduzir o Fe (III) a Fe (II). Após 144 horas de reação, os filmes enriquecidos em polissacarídeos e em óleo 1:5 não apresentaram diferenças significativas entre eles, sendo os que apresentaram melhores propriedades antioxidantes em relação aos restantes filmes. O filme com óleo 1:10 não mostrou diferenças significativas em relação aos filmes de quitosana com polissacarídeos, ceras e ao controle, mas teve um valor cerca de 50 % inferior em relação ao filme de óleo 1:5. Os filmes controle e ceras 1:10 foram os que apresentaram menores valores de atividade antioxidante, sendo significativamente inferiores em relação aos filmes com polissacarídeos e com óleo 1:5.

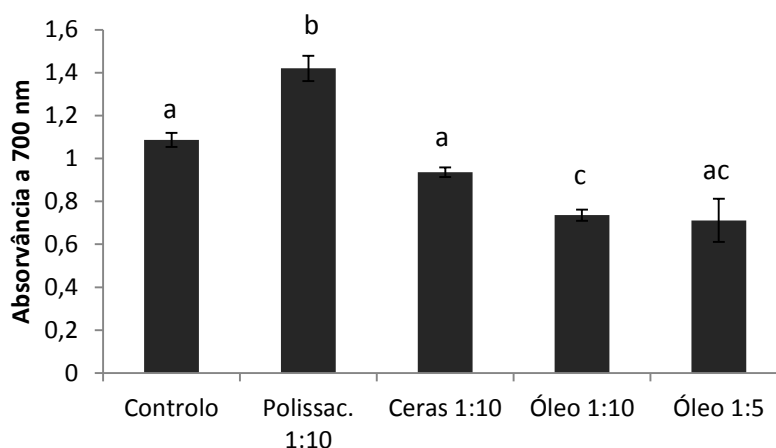
Os filmes com o óleo incorporados só ao fim de um longo tempo de contato com o reagente é que começam a reduzir o ião ferro, contrariamente ao que se observa para o filme com polissacarídeos, em que a redução ocorre principalmente nas primeiras horas de contato com o filme. Os filmes com ceras e com óleo, por serem mais hidrofóbicos, dificultam a interação entre as moléculas de quitosana e os iões de ferro, em meio aquoso. Com o passar do tempo, começa a haver uma maior difusão da solução pela malha do polímero de quitosana, logo uma maior interação entre os iões de ferro e os grupos amina

da quitosana e com os extratos incorporados no polímero, aumentando significativamente a sua ação antioxidante.

Tal como verificado para o DPPH, este método provou que o aumento da proporção do óleo nos filmes à base de quitosana conduz também a um aumento da atividade antioxidante, corroborando o facto deste extrato das grainhas de uva quando incorporado nos filmes de quitosana conferir propriedades antioxidantes.

#### 3.2.2.5. Método de poder redutor

À semelhança do método do FRAP, também o poder redutor consiste em avaliar a capacidade dos filmes em se oxidarem, reduzindo desta forma o ferro, formando um complexo corado que pode ser medido a 700 nm, em que o aumento da absorvância indica o aumento do poder redutor dos filmes. Na Figura 22 está representada a absorvância obtida para os diferentes filmes após 30 minutos de reação.



**Figura 22** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10) e óleo (1:10 e 1:5), pelo método do poder redutor, após 30 minutos de reação. (*letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$* )

Pela Figura 22 pode-se verificar que o filme com polissacarídeos foi o que apresentou o valor maior de absorvância, sendo 31 % superior que o filme controlo, enquanto os filmes enriquecidos em óleo 1:10 e 1:5 registaram as absorvâncias menores (cerca de 35 % menor que o filme controlo e de 50 % menor que o filme com polissacarídeos).

Com o método do poder redutor, verificou-se a mesma tendência observada no ABTS em água, ou seja, foi o filme mais hidrofílico (filme com polissacarídeos) que

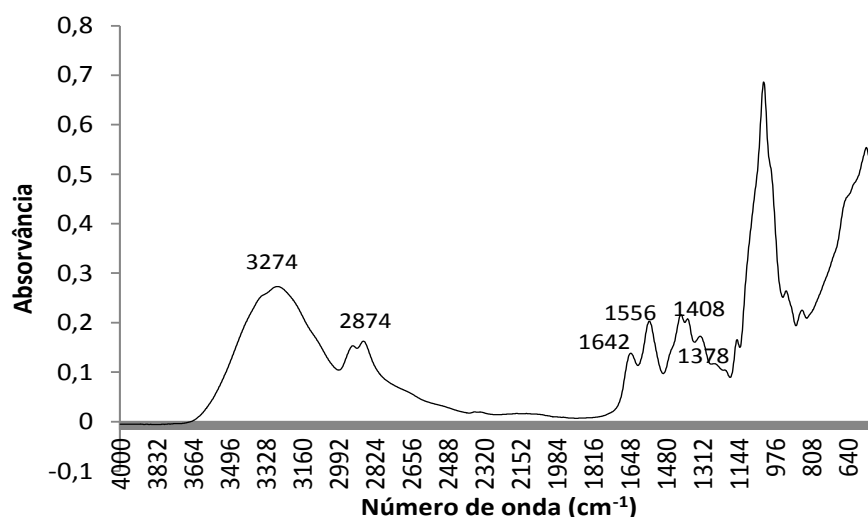
demonstrou maior atividade antioxidante, tendo os filmes mais hidrofóbicos (óleo 1:10 e 1:5) apresentado uma menor atividade antioxidante.

### **3.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO CONJUNTO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA**

Numa segunda fase do trabalho foram produzidos novamente filmes com os mesmos extratos obtidos do bagaço da vinificação e nas mesmas proporções numa tentativa de corroborar os resultados obtidos anteriormente. Foram também elaborados novos filmes com um incremento na proporção dos extratos, nomeadamente em óleo e ceras, uma vez que foi demonstrado pelos resultados obtidos que a incorporação destes extratos originam filmes com uma atividade antioxidante superior. Assim sendo, foram produzidos filmes com incorporação de **polissacarídeos 1:10, ceras 1:10 e 1:5, óleo 1:5 e 1:2**. Um filme de quitosana foi também produzido nas mesmas condições para servir como controlo. Os filmes foram avaliados em relação à humidade, solubilidade e atividade antioxidante. Foi também efetuada uma caracterização por FTIR e foram determinadas as propriedades mecânicas, os ângulos de contacto, as energias de superfície e as propriedades antimicrobianas dos filmes.

#### **3.3.1. FTIR aos filmes**

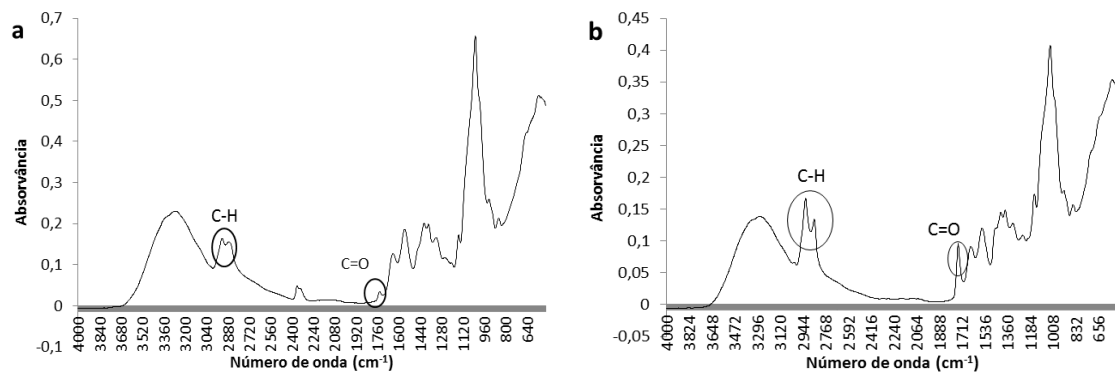
Na Figura 23 está representado o espectro de FTIR do filme controlo, ou seja, do filme apenas constituído por quitosana. Este espectro é caracterizado por uma banda intensa e ampla centrada a  $3274\text{ cm}^{-1}$ , que é atribuída ao estiramento (“stretching”) axial das ligações O-H e N-H. A banda observada a  $2874\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento axial das ligações C-H; as bandas centradas a  $1642$  e a  $1556\text{ cm}^{-1}$  são devido às vibrações da amida I e amida II, respetivamente. As bandas a  $1408$  e a  $1378\text{ cm}^{-1}$  resultam do acoplamento do estiramento axial de C-N e da deformação angular de N-H e as bandas observadas no intervalo de  $1150$  e  $924\text{ cm}^{-1}$  são devido às cadeias de polissacarídeos, incluindo ligações glicosídicas, e estiramento das ligações de C-O e C-O-C. Assim, o espectro obtido para o filme de quitosana está de acordo com os apresentados na bibliografia para a quitosana [95].



**Figura 23** – Espectro de FTIR do filme de quitosana (filme controlo).

Com a adição de polissacarídeos e ceras aos filmes de quitosana não foram verificadas diferenças a olho nú em relação ao espectro do filme controlo (Figura 23). Tal pode ser devido ao facto destes extratos terem sido incorporados em proporções baixas em relação à quitosana, sendo esta que predomina no espectro de FTIR.

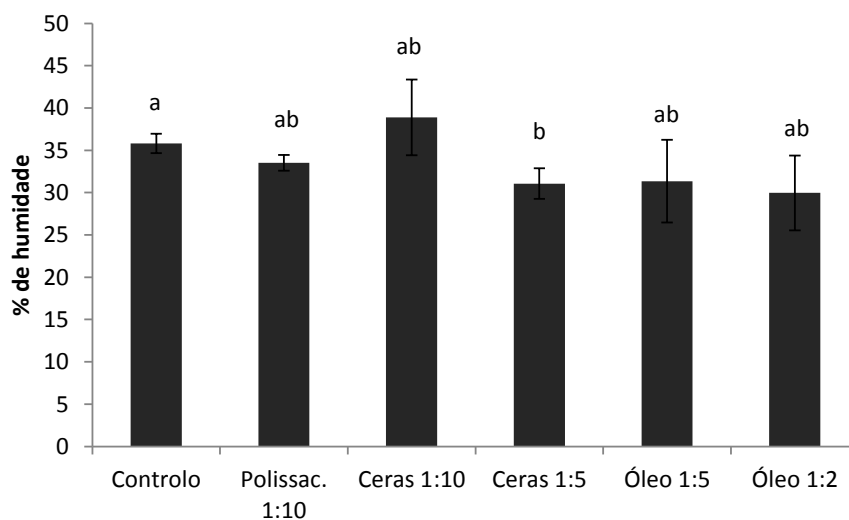
Tal como se pode verificar na Figura 24, os filmes de quitosana com incorporação do óleo apresentaram picos a 2922 e a 2856  $\text{cm}^{-1}$  mais intensos, principalmente no espectro de FTIR dos filmes com óleo na proporção de 1:2. Estas bandas correspondem às vibrações de estiramento antissimétricas e simétricas das ligações alifáticas C-H em grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (alcanos), que são características dos óleos [98]. Nestes espectros existe o aparecimento de um pico a 1742  $\text{cm}^{-1}$  que representa a vibração por estiramento dos grupos carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ) dos triacilglicerídeos, comprovando a presença de óleo nos filmes à base de quitosana.



**Figura 24** – Espectro de FTIR dos filmes à base de quitosana com óleo incorporado na razão de (a) 1:5 (óleo 1:5) e (b) 1:2 (óleo 1:2).

### 3.3.2. Humidade e solubilidade

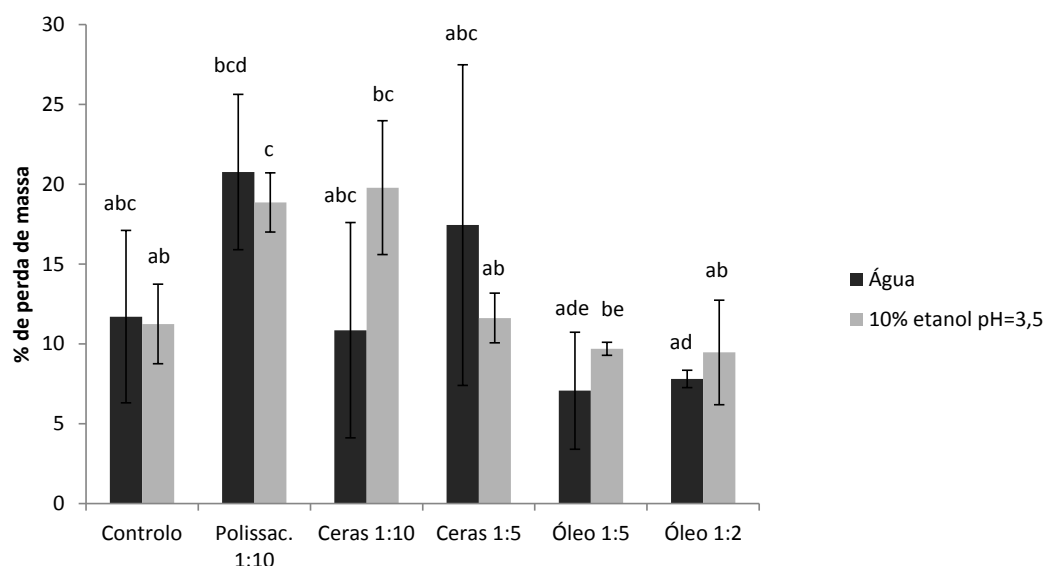
Na Figura 25 encontra-se representada a percentagem de humidade determinada para todos os filmes desenvolvidos. A percentagem de humidade variou entre 30 a 39 %, tal como já se tinha verificado para os filmes preparados anteriormente. Apenas o filme enriquecido em ceras na proporção de 1:5 teve uma percentagem de humidade ligeiramente inferior, apenas de 13 %, em relação ao filme controlo constituído apenas por quitosana.



**Figura 25** – Percentagem de humidade do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

A solubilidade em água e numa solução hidro-alcoólica ácida também foi determinada para estes filmes, estando representada na Figura 26. A solubilidade entre os diferentes filmes foi bastante idêntica, devido à elevada dispersão de valores de

percentagem de perda de massa. Para estes filmes, a solubilidade nunca foi superior a 21 % (filme de polissacarídeos), ou seja, estes valores obtidos foram ligeiramente inferiores aos obtidos para os filmes anteriores, que tinham uma percentagem de perda de massa máxima de 31 %. De uma forma geral, apesar da comparação entre os diferentes filmes ser difícil devido à grande dispersão de valores, pode-se verificar que os filmes com o óleo tiveram a tendência para apresentar uma solubilidade inferior tanto em água como na solução com 10 % de etanol a pH ácido. Esta diferença é mais significativa quando comparada com os resultados de solubilidade obtidos para o filme com polissacarídeos, permitindo inferir que a diminuição da perda de massa dos filmes esteja relacionada com aumento da hidrofobicidade das suas superfícies.



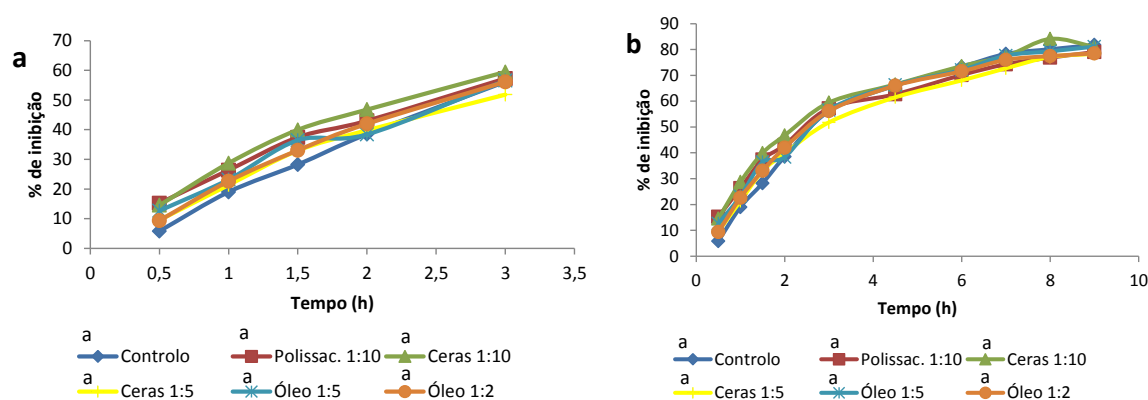
**Figura 26** – Solubilidade (% perda de massa) do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2) em água e numa solução ácida (pH 3,5) com 10 % de etanol. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

O facto da dispersão dos valores de solubilidade dos filmes ter sido relativamente grande pode dever-se à perda de massa ter sido muito reduzida, o que origina erros maiores de pesagem. Além disso, estes filmes eram heterogéneos em termos de espessura. Apesar do suporte que contém os filmes na estufa ter sido nivelado, a medição da espessura mostrou que existiam zonas mais espessas que outras. Esta diferença pode ter levado a uma maior percentagem de perda de massa em alguns quadrados de filme em relação a outros.

### 3.3.3. Atividade antioxidante

#### 3.3.3.1. Método de ABTS preparado em água

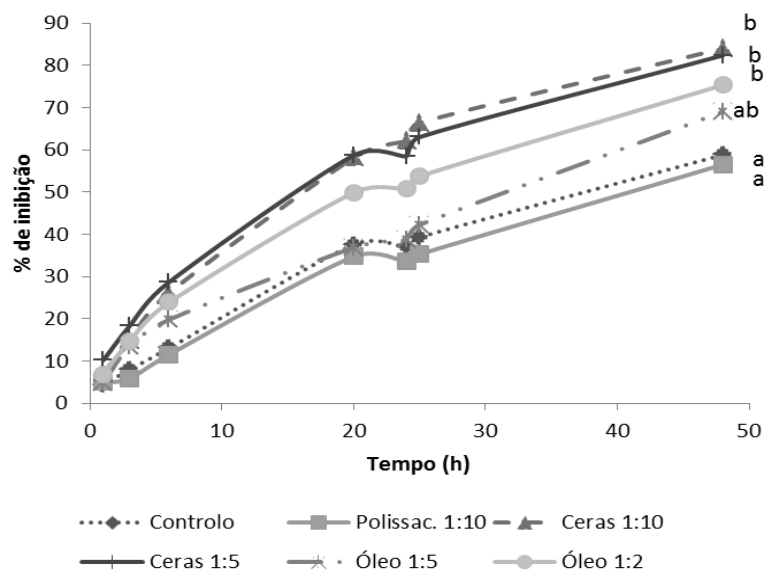
Na Figura 27 estão representadas as atividades antioxidantes determinadas pelo método de ABTS em água até 3 e 9 horas de reação para os diferentes filmes produzidos. Tanto após 3 horas como após 9 horas de reação, não se verificaram diferenças significativas na percentagem de inibição. Quando se utiliza a água como solvente no método de ABTS, a cinética da reação é muito rápida, dificultando a visualização das diferenças entre os filmes à base de quitosana.



**Figura 27** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em água, ao longo do tempo: (a) após 3 h (b) após 9 h. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

#### 3.3.3.2. Método de ABTS preparado em etanol

A atividade antioxidante dos filmes à base de quitosana foi também determinada pelo método de ABTS usando como solvente o etanol (Figura 28). Os filmes enriquecidos em ceras nas proporções de 1:10 e 1:5 e no óleo na proporção de 1:2 foram os que apresentaram maior atividade antioxidante após 48 horas de reação, entre 75 a 84 % de inibição. Por sua vez, o filme enriquecido em polissacarídeos e o controlo e foram os que menor atividade antioxidante apresentaram, 56 e 59 % de inibição, respetivamente. O filme de quitosana enriquecido em óleo na proporção de 1:5 não apresentou qualquer diferença significativa com os restantes filmes.



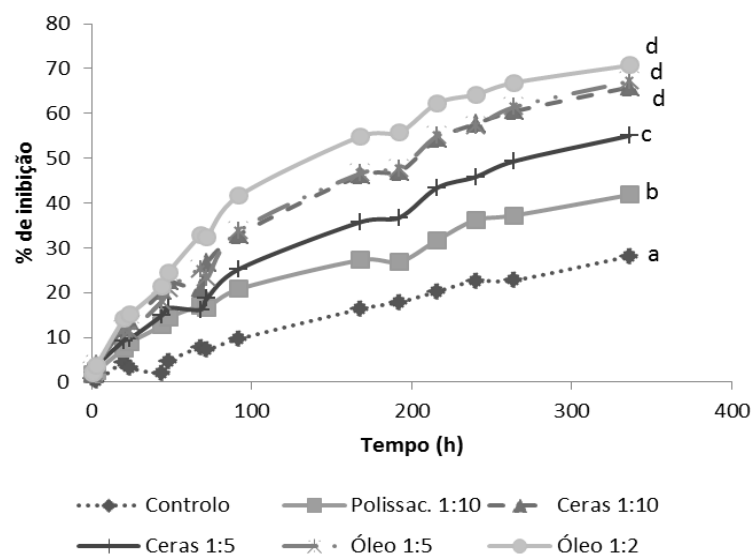
**Figura 28** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controle) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em etanol, ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

Comparando os resultados obtidos para estes filmes com os resultados dos filmes anteriores para o mesmo método (ponto 3.2.2.2) pode-se verificar que em ambas as situações os filmes com polissacarídeos apresentaram menor percentagem de inibição ao longo do tempo. Por outro lado, os filmes enriquecidos em ceras e óleo foram os que apresentaram maior percentagem de inibição, isto é maior atividade antioxidante. Assim, para o método de ABTS em etanol, os filmes mais hidrofílicos apresentaram menores percentagens de inibição e os filmes mais hidrofóbicos demonstraram ter maiores valores. No entanto, o aumento da proporção de extrato incorporado não incrementou significativamente a atividade antioxidante dos filmes.

#### 3.3.3.3. Método de DPPH

Na Figura 29 está representada a atividade antioxidante dos filmes pelo método de DPPH ao longo de 336 horas de reação. Os filmes com incorporação de óleo na razão de 1:2 e 1:5 e ceras na de 1:10 foram os que captaram mais radicais de DPPH, com uma percentagem de inibição entre 66 a 71 %, sendo estes valores cerca de 2,5 vezes superiores em relação ao filme controle, que só obteve uma percentagem de inibição de 28 %. As ceras 1:5 apresentaram uma percentagem de inibição de 55 %, ou seja 2 vezes superior ao controle e o filme enriquecido em polissacarídeos obteve uma percentagem de inibição de 42 %, uma percentagem 49 % superior ao filme controle.



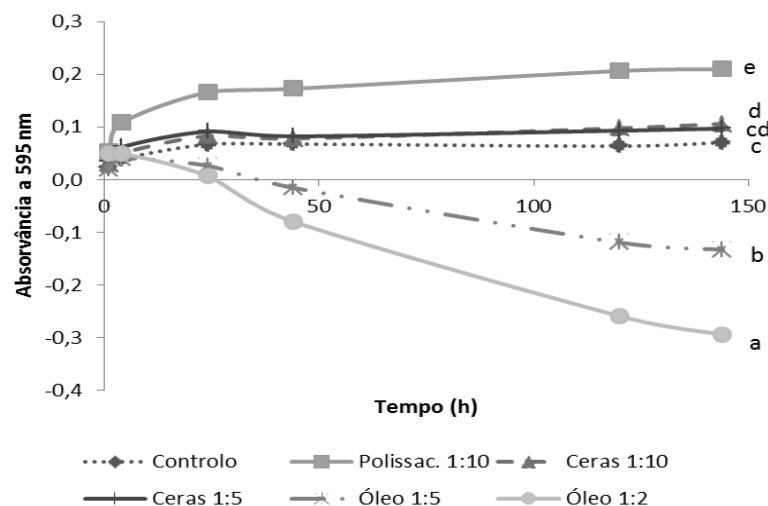


**Figura 29** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controlo) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de DPPH, ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

Comparando com os filmes anteriores (ponto 3.2.2.3), apesar de se verificarem algumas diferenças, em ambos foi o filme controlo que menor atividade antioxidante apresentou e os filmes mais hidrofóbicos foram os que maiores atividades demonstraram. No entanto, enquanto nos filmes anteriores a atividade antioxidante aumentou com o aumento da proporção de óleo no filme, nestes filmes apenas o incremento de ceras de 1:10 para 1:5 originou um aumento da atividade antioxidante. É possível que não se tenha verificado um aumento da capacidade antioxidante dos filmes com o aumento da proporção de óleo pelo facto da atividade destes já ser bastante elevada.

#### 3.3.3.4. Método de FRAP

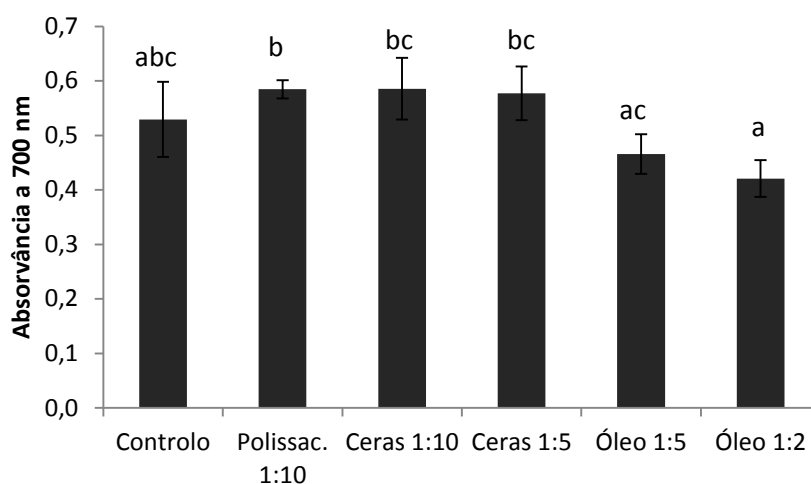
Utilizando o FRAP (Figura 30) foi claramente visível que o filme enriquecido em polissacarídeos foi o que maior atividade antioxidante demonstrou, com um valor 3 vezes superior em relação ao controlo, ao fim de 148 horas. Os filmes enriquecidos em ceras na proporção de 1:10 também tiveram uma absorvância significativamente superior em relação ao controlo (51 % superior). O filme enriquecido em ceras na proporção de 1:5 não mostrou diferenças significativas em relação ao filme controlo e ao filme ceras 1:10. Ambos os filmes enriquecidos em óleo apresentaram absorvâncias negativas, ou seja, a absorvância lida a 595 nm foi menor que a absorvância do branco, que continha tudo exceto o filme. Deste modo, estes resultados não podem ser considerados. Estes valores não estão de acordo com os obtidos anteriormente para o mesmo ensaio (ponto 3.2.2.4).



**Figura 30** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controle) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de FRAP, ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

### 3.3.3.5. Método do poder redutor

A atividade antioxidante dos diferentes filmes obtidos determinada pelo método do poder redutor após 30 minutos de reação, está representado na Figura 31. Tal como se pode verificar, o filme controle não apresentou qualquer diferença significativa na absorvância em relação aos restantes filmes. Os filmes com polissacarídeos, ceras 1:10 e 1:5 foram os que mostraram um maior valor de absorvância enquanto os filmes com óleo 1:5 e 1:2 foram os que apresentaram menores valores de absorvância, logo menor atividade antioxidante.



**Figura 31** – Atividade antioxidante do filme de quitosana (controle) e dos filmes à base de quitosana enriquecidos com polissacarídeos (1:10), ceras (1:10 e 1:5) e óleo (1:5 e 1:2), pelo método de ABTS em água, após 30 minutos de reação. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

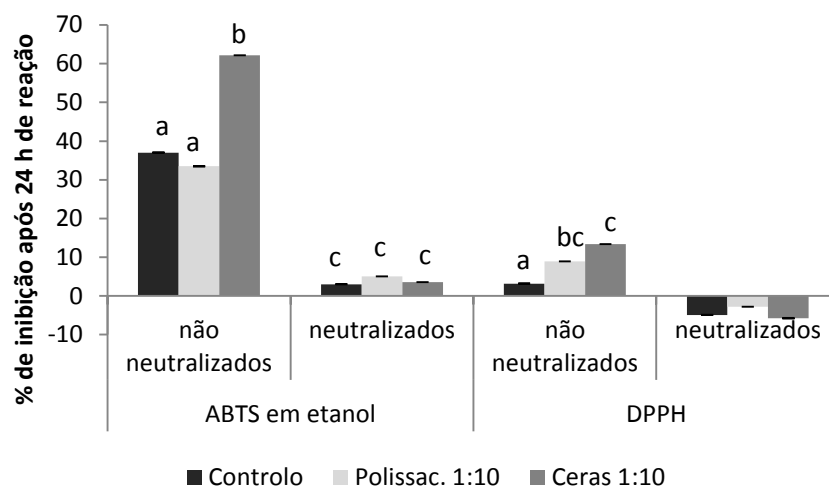
Tal como já se tinha verificado para os filmes preparados anteriormente para o método do poder redutor, os filmes à base de quitosana enriquecidos em óleo, ou seja, os filmes mais hidrofóbicos, foram os que apresentaram menores atividades antioxidantes. Neste método também se verificou que o aumento da quantidade de ceras ou óleo incorporado aos filmes não se reflete num aumento da atividade antioxidante.

Comparando todos os métodos para a determinação da atividade antioxidante, pode-se constatar, de uma forma geral, que quando se utilizaram métodos com solventes orgânicos, como o ABTS em etanol e o DPPH, os filmes hidrofóbicos foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante. Por outro lado, quando os métodos utilizaram solventes aquosos, como foi o caso do ABTS em água, do FRAP e do poder redutor, os filmes mais hidrofílicos, nomeadamente o filme com polissacarídeos, demonstraram ter maior potencial antioxidante. Constatou-se, ainda, que quanto maior a proporção de extratos, neste caso, de óleo (como verificado no método de DPPH nos primeiros filmes) e ceras (método de DPPH nos segundos filmes), maior foi a resposta antioxidante, comprovando a capacidade antioxidante destes extratos quando incorporados nos filmes.

#### 3.3.3.6. Neutralização dos filmes

A atividade antioxidante foi determinada para alguns filmes que foram previamente neutralizados, nomeadamente um controlo contendo apenas quitosana, o filme polissacarídeos numa proporção de 1:10 de polissacarídeos:quitosana e um filme contendo ceras também na proporção de 1:10. Estes filmes foram neutralizados, ou seja, o seu pH foi corrigido para cerca de 7, de forma a averiguar se esta neutralização implicava uma alteração da sua atividade antioxidante.

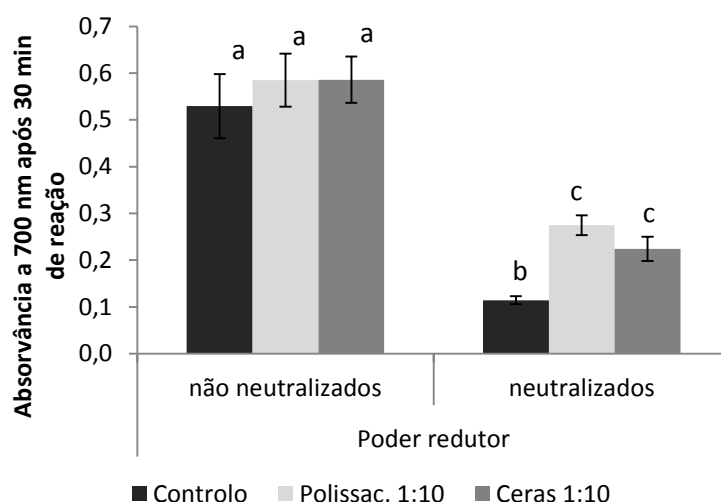
Na Figura 32 está representada a percentagem de inibição dos filmes que foram neutralizados e os respetivos filmes não neutralizados, determinada pelo método de ABTS em etanol e pelo DPPH.



**Figura 32** – Atividade antioxidante de filmes neutralizados e não neutralizados (controlo, polissacarídeos 1:10, ceras 1:10) após 24 horas de reação, pelo método de ABTS em etanol e pelo método de DPPH. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

Tal como se pode verificar pela Figura 32, de uma forma geral, os filmes não neutralizados apresentaram maior atividade antioxidante do que os neutralizados. No método de ABTS preparado em etanol, os filmes neutralizados não mostraram diferenças significativas entre si, mas apresentaram uma menor atividade antioxidante em relação aos filmes não neutralizados (85 a 94 % inferior). A mesma tendência foi verificada para o método de DPPH, apesar de não tão acentuada, dado que a velocidade da reação é bastante menor. Pode-se constatar ainda que os filmes neutralizados apresentaram uma percentagem de inibição negativa, ou seja, a absorvância medida foi inferior à do branco, indicando que a neutralização dos filmes conduziu a que estes tivessem uma atividade pró-oxidante, isto é, ao invés de protegerem da oxidação, estavam a promover essa mesma oxidação.

Na Figura 33 estão representados os valores obtidos pelo método do poder redutor após 30 minutos de reação dos filmes controlo, polissac. 1:10 e ceras 1:10 neutralizados e não neutralizados. Não existem diferenças entre os diferentes filmes não neutralizados, no entanto, os correspondentes filmes neutralizados apresentaram uma atividade antioxidante significativamente menor. A atividade antioxidante do filme controlo neutralizado é 79 % inferior em relação ao não neutralizado, o enriquecido em polissacarídeos é 53 % inferior e o filme com as ceras incorporadas é 63 % inferior. Assim, o método do poder redutor, que ao contrário do ABTS e DPPH não é um método de captura de radicais e o seu solvente é aquoso, vem corroborar o facto dos filmes não neutralizados terem um poder antioxidante superior aos filmes neutralizados.



**Figura 33** – Atividade antioxidante dos filmes neutralizados e não neutralizados (controlo, polissacarídeos 1:10, ceras 1:10) após 30 minutos de reação, pelo método do poder redutor. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=3$ )

Apesar dos mecanismos da atividade antioxidante da quitosana ainda serem pouco conhecidos, assume-se que este polímero tenha a capacidade de quelatar iões de transição, nomeadamente os iões ferro. Assim, ao neutralizarem-se os filmes, existem mais grupos amina que não estão protonados, isto é, existem mais grupos amina na forma de  $\text{NH}_2$ , e o par de eletrões do azoto da amina está disponível para doar os eletrões aos iões metálicos, logo o efeito antioxidante deveria ser maior. No entanto, tal não se verificou, a neutralização não aumentou a capacidade antioxidante dos filmes, pelo contrário, estes apresentaram atividades antioxidantes inferiores nos diferentes métodos.

### 3.3.4. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos vários filmes foram estudadas por ensaios de tensão uniaxial à rutura. Determinaram-se as espessuras dos diferentes filmes, necessárias para a determinação das suas propriedades mecânicas. A espessura variou entre 0,39 e 0,57  $\text{mm}^2$ , com o filme controlo a apresentar o menor valor, enquanto o filme com óleo incorporados na proporção de 1:2 foi o que apresentou a maior espessura. Os filmes foram submetidos a uma deformação crescente. Efetuaram-se curvas de tensão em função da deformação para os vários filmes e a partir destas foi possível determinar os vários parâmetros mecânicos, nomeadamente, a força de tensão, a taxa de deformação no ponto de rutura e o módulo de Young.

**Tabela 12** – Propriedades mecânicas dos filmes à base de quitosana com polissacarídeos, ceras e óleo incorporados.

	Força de tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Young (MPa/%)
Controlo	12,61 ± 1,02 <sup>(a)</sup>	44,24 ± 2,67 <sup>(a, c)</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>(a)</sup>
Polissac. 1:10	13,58 ± 1,09 <sup>(a)</sup>	47,25 ± 2,91 <sup>(a, b)</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>(a, b)</sup>
Ceras 1:10	10,99 ± 3,09 <sup>(a, b, c)</sup>	53,48 ± 9,05 <sup>(b, c)</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>(c)</sup>
Ceras 1:5	9,89 ± 1,27 <sup>(b)</sup>	49,57 ± 1,24 <sup>(b)</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>(c, d)</sup>
Óleo 1:5	12,34 ± 1,61 <sup>(a, b)</sup>	41,11 ± 2,69 <sup>(c)</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>(b)</sup>
Óleo 1:2	6,97 ± 0,59 <sup>(c)</sup>	35,11 ± 1,46 <sup>(e)</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>(a, d)</sup>

(letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=5$ )

Tal como se pode constatar pela Tabela 12, os valores de força de tensão na rutura, ou seja, a força que foi necessária aplicar a um filme até que este entre em ponto de rutura, foram muito semelhantes entre si para os diferentes filmes. De uma forma geral, verificou-se uma tendência para os filmes enriquecidos em ceras e em óleo na proporção de 1:5 terem um comportamento semelhante entre si e apresentarem valores de força de tensão ligeiramente inferiores em relação ao controlo e ao filme com polissacarídeos. O filme com a maior proporção em óleo foi o que obteve menores valores de força de tensão na rutura, entre 30 a 49 % e inferior em relação aos restantes filmes, não apresentando apenas diferenças significativas em relação ao filme com ceras 1:10.

A incorporação dos polissacarídeos nos filmes de quitosana não alterou a força de tensão do filme em relação ao filme controlo, por um lado porque este extrato, sendo constituído maioritariamente por polissacarídeos, tem um comportamento mecânico próximo da quitosana e também porque a sua proporção no filme era muito reduzida. A diminuição da força de tensão dos filmes com ceras e óleo em proporções elevadas conduzem a uma interrupção da matriz do polímero formando pontos mais fracos no filme que diminuem a sua resistência mecânica. Vargas *et al.* [53] verificaram que a introdução de ácido oleico nos filmes de quitosana conduziu à diminuição da força de tensão pelos mesmos motivos. A baixa força de tensão destes filmes também pode ser devida à baixa resistência mecânica dos óleos e das ceras [8].

Quanto à taxa de deformação no ponto de rutura, ou seja, a distância máxima que um filme pode esticar antes de entrar em rutura, os diferentes filmes também não apresentaram muitas diferenças entre si. Tal como para a força de tensão, também para a

taxa de deformação, os filmes com ceras e com óleo na razão de 1:5 apresentaram valores de alongação semelhantes entre si e tendencialmente inferiores em relação ao filme controle e com polissacarídeos. Mais uma vez, foi o filme com óleo na proporção de 1:2 que menores valores obteve, com 35 % de deformação, ou seja, entre 15 a 34 % inferior em relação aos restantes filmes.

O módulo de Young traduz a elasticidade de um filme, e os seus valores são obtidos da região inicial do gráfico de força de tensão vs taxa de deformação, onde se verifica linearidade. Nesta zona linear, se a tensão for removida, o material retoma as suas dimensões iniciais, daí traduzirem as propriedades elásticas dos filmes que estão relacionadas com a sua rigidez. A incorporação das ceras nos filmes de quitosana conduziram a uma diminuição do módulo de Young relativamente ao filme controle e com polissacarídeos. Por sua vez, a incorporação do óleo na proporção de 1:5 levou a que os filmes aumentassem a sua rigidez (maiores valores de módulo de Young) em relação ao filme controle e às ceras. No entanto, quando a proporção de óleo aumentou de 1:5 para 1:2 verificou-se uma redução de 30 % na rigidez do filme, tornando-se mais elástico.

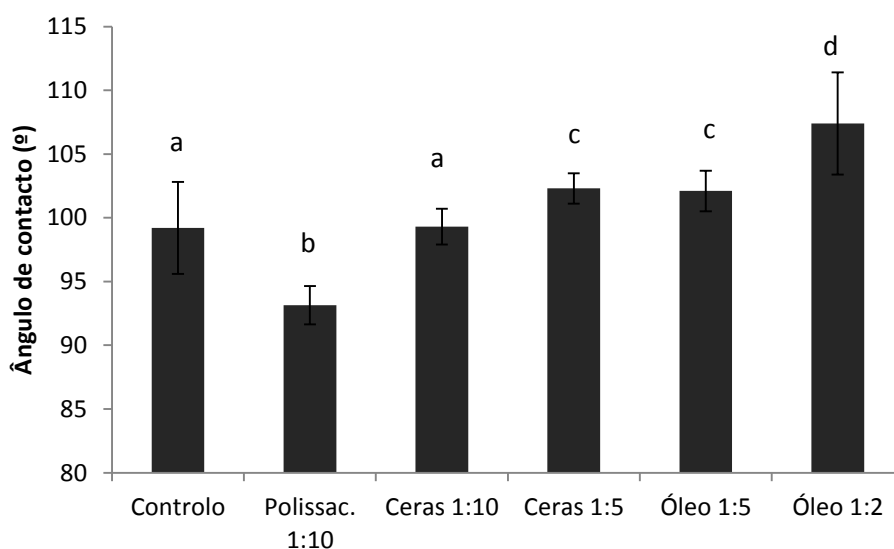
De uma forma geral, a incorporação de polissacarídeos não provocou diferenças significativas no filme em relação ao controle, enquanto a incorporação dos extratos hidrofóbicos conduziu à diminuição da alongação e do módulo de Young, com a exceção dos filmes com óleo 1:5. Os lípidos possuem uma estrutura rígida o que conduz à diminuição da plasticidade dos filmes. Yoshida *et al.* [105] verificaram que a adição de glicerol como plastificante aumentou a taxa de deformação, ou seja, a flexibilidade dos filmes, no entanto a incorporação de lípidos (ácido palmítico, cera de abelha e cera de carnaúba) diminuiu a flexibilidade dos filmes devido à sua estrutura rígida. Além disso, também verificaram, para concentrações altas destes extratos e dado que já tinha sido incorporado plastificante, que os valores destas propriedades mecânicas dos filmes diminuam devido à baixa coesão entre os óleos ou ceras e o polímero de quitosana. Sánchez-González *et al.* [54] também demonstraram que quanto maior a proporção do óleo essencial de tangerina, menor os valores de deformação e módulo de Young devido à descontinuidade da matriz polimérica introduzida pela adição do óleo e pela modificação das interações moleculares quando o óleo está presente.

Vargas *et al.* [53] verificaram que as condições de homogeneização das dispersões formadoras de filmes com ácido oleico incorporado são muito importantes, pois quanto

mais dispersas estiverem as partículas (ou seja menores tamanhos), mais interações entre estas e as moléculas de quitosana e, conseqüentemente, maiores os valores de força de tensão e do módulo de Young em relação às partículas com maiores tamanhos. Como no presente trabalho as ceras e o óleo da grainha da uva foram dispersas apenas recorrendo a uma placa de agitação, é possível que o seu tamanho mais elevado não tenha permitido uma interação otimizada com as moléculas de quitosana.

### 3.3.5. Ângulos de contacto e energias de superfície

A determinação dos ângulos de contacto dos filmes desenvolvidos foi feita usando água ultra pura como solvente e teve como objetivo verificar a afinidade existente entre a superfície dos diferentes filmes e a água. Para determinar os ângulos de contacto, colocou-se uma gota de água ultra-pura na superfície dos filmes com o objetivo de se conhecer a sua natureza hidrofílica. Quando a gota entra em contacto com a superfície, estabelecem-se interações intermoleculares entre a superfície do filme e a gota de água que podem ser forças atrativas ou repulsivas. Deste modo, quanto maior for o ângulo de contacto menor é a afinidade da superfície em questão para a água, ou seja, mais hidrofóbica é esta superfície. Na Figura 34 estão representados os resultados dos ângulos de contacto dos diferentes filmes com a água ultra pura.

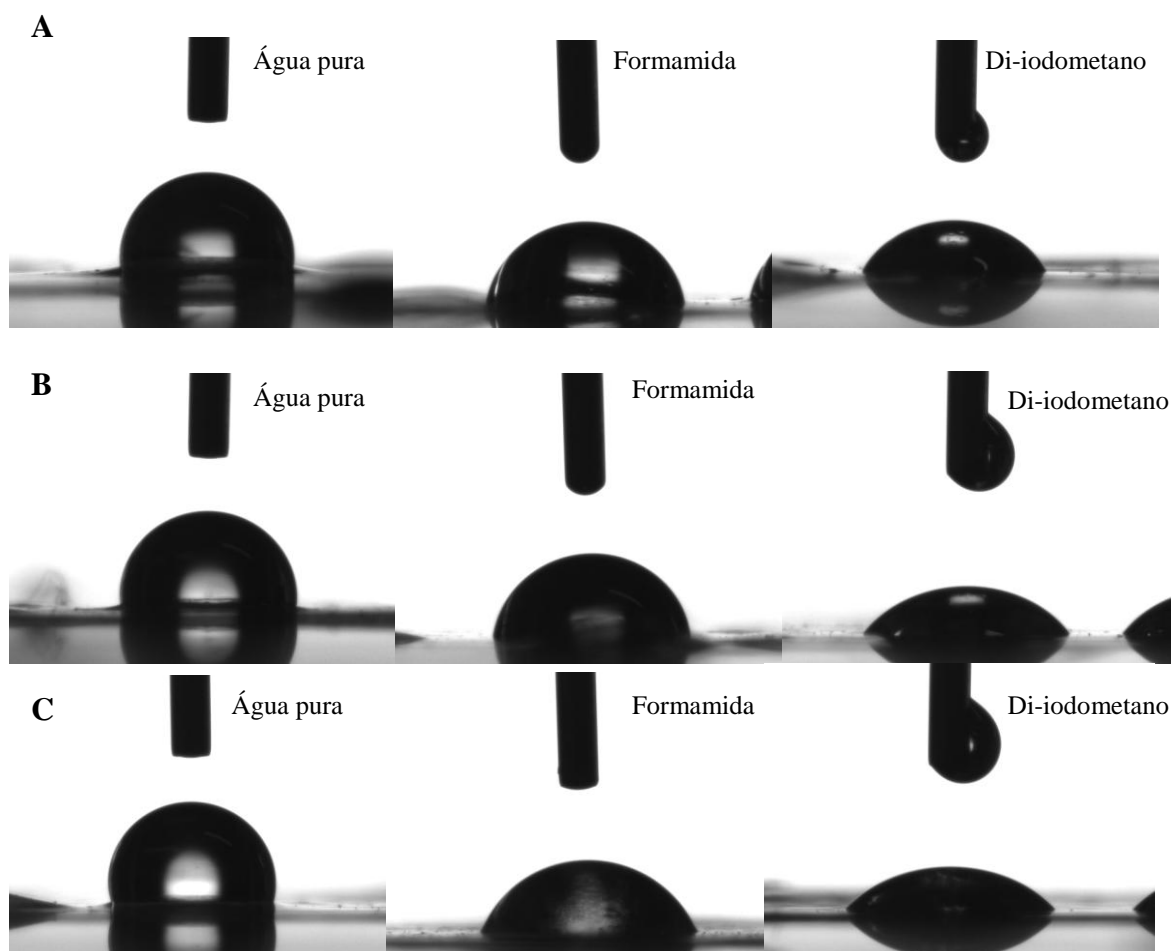


**Figura 34** – Ângulos de contacto (usando água como solvente) da superfície dos filmes de quitosana (controlo), e de quitosana com polissacarídeos, óleo e ceras. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$  e  $n=9$ )



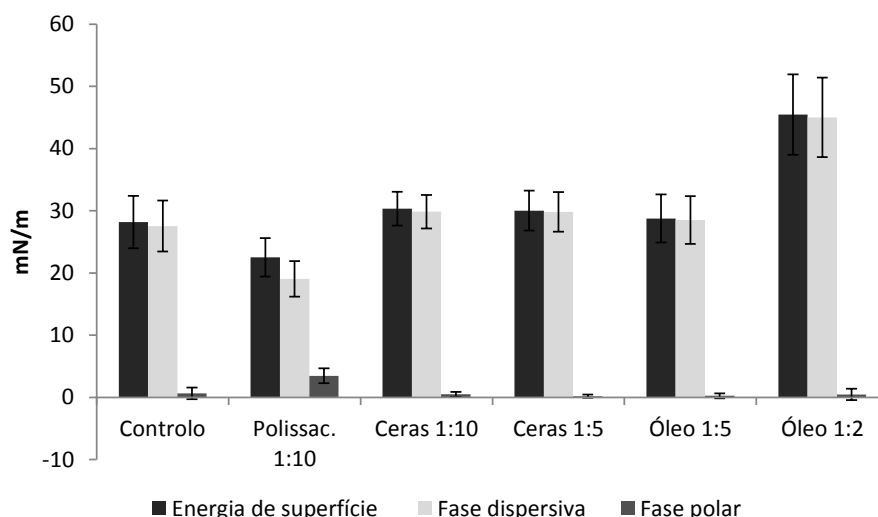
O ângulo de contacto do filme com polissacarídeos diminuiu significativamente em relação ao filme controlo, ou seja este filme é mais hidrofílico que o filme apenas constituído por quitosana. Este filme foi o que apresentou o menor ângulo de contato, provavelmente devido à natureza hidrofílica dos polissacarídeos. Quando se adicionaram ceras na proporção de 1:10, o filme obtido não mostrou diferenças significativas em termos de polaridade em relação ao filme controlo, provavelmente porque a proporção de ceras em relação ao polímero de quitosana era muito reduzida. O filme enriquecido em ceras com uma proporção de 1:5 e em óleo na razão de 1:5 teve um aumento do seu ângulo de contacto de cerca de 3 % em relação ao controlo. No entanto, foi o filme com a incorporação de óleo 1:2 que apresentou um maior ângulo de contacto (8 % em relação ao controlo), mostrando que, de facto, estes filmes são mais hidrofóbicos que o filme de quitosana. Assim, quanto maior a razão de extratos hidrofóbicos incorporados nos filmes, maior a sua hidrofobicidade. Estes resultados estão de acordo com o verificado por Perede *et al.* [106], referiram que o aumento da concentração de azeite em filmes à base de quitosana conduz a um aumento do ângulo de contacto com a água devido à natureza hidrofóbica dos lípidos adicionados.

Para analisar melhor a polaridade dos vários filmes, determinaram-se também as suas energias de superfície e a contribuição das fases dispersivas e polares. Para tal utilizaram-se a água ultra pura (elevada polaridade), a formamida (polaridade intermédia) e o di-iodometano (apolar). Na Figura 35 (A, B e C) estão representadas as imagens obtidas para os ensaios de medição das energias de superfície usando estes três solventes de diferentes polaridades para os filmes controlo, polissacarídeos 1:10 e óleo 1:2. Estes três filmes foram utilizados a título de exemplo.



**Figura 35** – Gota de água pura, formamida e di-iodometano no momento em que entra em contato com a superfície do filme à base de quitosana: A) filme controlo; B) filme com polissacarídeos 1:10; (C) filme com óleo 1:2.

Verificou-se que existe muito menos interação entre a água, o solvente de elevada polaridade, e os diferentes filmes, do que entre o di-iodometano, o solvente apolar, ou seja, os filmes são essencialmente de natureza apolar. Na Figura 36 estão representadas as energias de superfície, assim como as contribuições das fases dispersivas e polares para os diversos filmes.



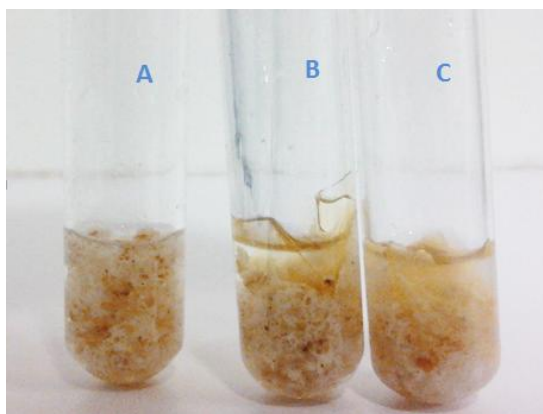
**Figura 36** – Energia de superfície, fase dispersiva e fase polar dos filmes de quitosana (controlo) e de quitosana com polissacarídeos, óleo e ceras.

A Figura 36 mostra que, à semelhança do que aconteceu para os ângulos de contacto, quando se incorporaram os polissacarídeos a fase dispersiva diminuiu e aumentou a fase polar em relação ao controlo, evidenciado o aumento da hidrofilicidade do filme. Em relação os filmes com ceras 1:10 e 1:5 e óleo 1:5 não existem diferenças significativas nas energias de superfícies e, consequentemente, nas fases dispersivas e polares. No entanto, o filme enriquecido na maior proporção de óleo mostrou um aumento significativo na energia de superfície e na fase dispersiva em relação aos restantes filmes, enquanto a fase polar parece não apresentar diferenças significativas. Estes resultados também permitem verificar que o óleo aumenta a hidrofobicidade do filme, e, consequentemente, a sua energia de superfície e fase dispersiva.

### 3.3.6. Propriedades antimicrobianas

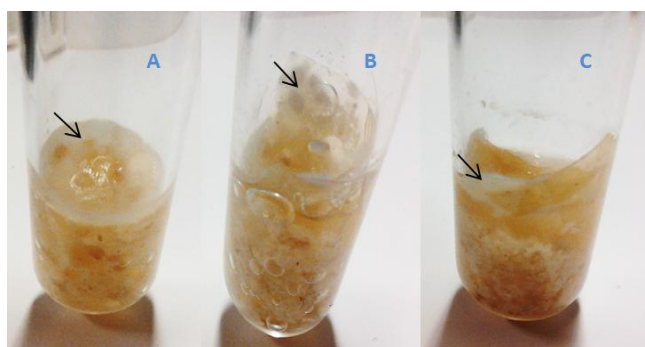
Efetou-se um teste simples e qualitativo para testar as propriedades antifúngicas dos filmes à base de quitosana em pão, nomeadamente do filme controlo, constituído apenas por quitosana e do filme com óleo numa razão de 1:2 (óleo:quitosana). O filme óleo 1:2 foi utilizado neste teste, por ser o que tinha na sua constituição maior percentagem de óleo e, assim, tentar perceber, por um lado, se o óleo também tinha algumas propriedades antimicrobianas e, por outro, se dificultava a ação antimicrobiana da quitosana por aumentar a impermeabilidade do filme devido às suas propriedades hidrofóbicas. Na

Figura 37 podem-se observar os três tubos de ensaio contendo pão embebido em água no início do teste. O tubo A apenas contém pão, o tubo B contém pão e filme controle e o tubo C contém pão e filme com óleo 1:2.

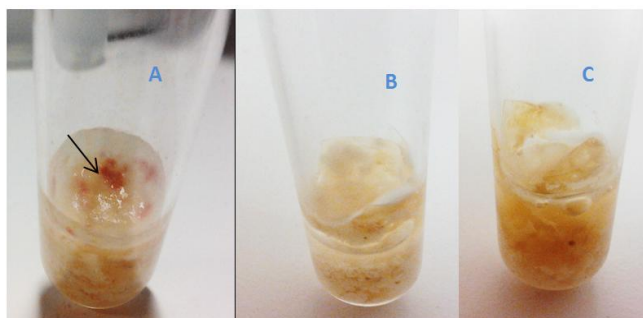


**Figura 37** – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água no início do teste. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controle; (C) tubo com filme com óleo 1:2.

Os tubos foram deixados à temperatura ambiente e a sua evolução microbiológica foi observada ao longo do tempo. Na Figura 38 podem-se observar os três tubos de cultura após 4 dias. Tanto no tubo sem filme (A), como nos tubos contendo os filmes (B e C), houve crescimento de fungos de coloração branca, ou seja, os filmes de quitosana não preveniram o aparecimento de fungos no pão. No entanto, pode-se constatar que no tubo com o filme com óleo incorporado o crescimento foi visualmente menor. Este crescimento microbiano continuou a ser observado e a sua evolução após 6 dias está representada na Figura 39.



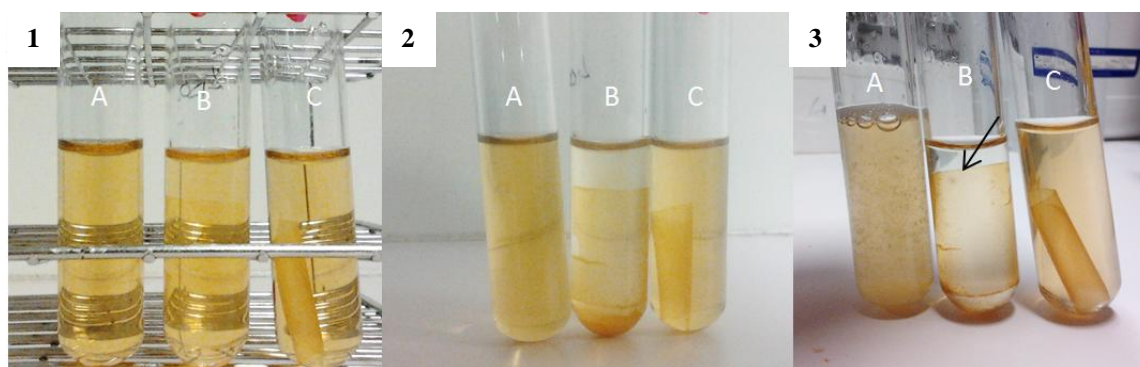
**Figura 38** – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água após 4 dias. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controle; (C) tubo com filme com óleo 1:2.



**Figura 39** – Tubos de ensaio contendo pão embebido em água após 6 dias. (A) tubo sem filme; (B) tubo com filme controle; (C) tubo com filme óleo 1:2.

De acordo com a Figura 39 pode-se constatar que no tubo A apareceram alguns fungos com uma coloração avermelhada ao fim de 6 dias, que não foram observados nos tubos B e C, contendo os filmes de quitosana e quitosana com óleo, respetivamente. Assim, apesar dos filmes de quitosana não terem inibido o crescimento de todos os tipos de fungos, as suas propriedades antimicrobianas foram verificadas para pelo menos uma espécie de fungos.

As propriedades antimicrobianas dos filmes testados no ponto anterior, ou seja, o filme controle e o filme com óleo incorporado também foram testadas em sumo de maçã. Foi realizado um teste simples, onde se mergulharam um filme controle (tubo B) e um filme óleo 1:2 (tubo C) em sumo de maçã. Efetuou-se também um branco (tubo A). Na Figura 40 está representada a evolução microbiana dos diferentes tubos ao longo do tempo.

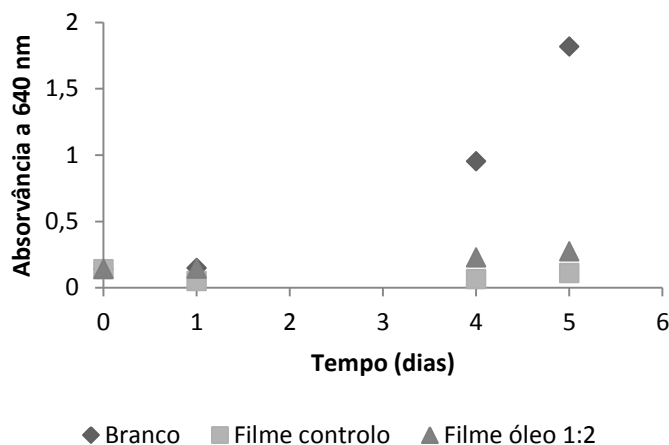


**Figura 40** – Tubos de ensaio contendo sumo de maçã. (A) branco (sem filme); (B) tubo com filme controle; (C) tubo com filme óleo 1:2. (1) tempo 0; (2) após 24 horas; (3) após 4 dias.

Pela Figura 40 (1) pode-se observar que não existem diferenças de turbidez entre os diferentes tubos com sumo de maçã no tempo inicial. Após 24 horas (Figura 40 (2)) verificou-se que o tubo sem filme (A) e o tubo contendo o filme com óleo na razão de 1:2 (C) visualmente não se tinham alterado. No entanto, verificou-se uma alteração no sumo

contendo o filme controlo, pois foi observado um precipitado no fundo do tubo e na superfície do filme de quitosana. No tubo B, o filme de quitosana conduziu a um aumento de pH de 4 para 5, que por sua vez levou à precipitação de compostos existentes no sumo de maçã. Tal como foi referido anteriormente no ponto 1.5.5, uma aplicação da quitosana é a de clarificação de sumos, nomeadamente de sumos de uva e de maçã, por controlarem a sua acidez e diminuírem a sua turbidez [20]. De forma a este precipitado não conduzir a um falso positivo, o sumo foi centrifugado e o precipitado foi removido. Na Figura 40 (3), foi possível verificar que o sumo de maçã sem filme tinha uma elevada turbidez após 4 dias. Além disso, também foi possível observar algumas bolhas na interface líquido/ar. Estas bolhas são possivelmente de dióxido de carbono ou de hidrogénio resultantes da fermentação microbiana dos açúcares presentes no sumo. No filme controlo desenvolveram-se fungos de cor branca, que não estavam presentes no sumo sem filme, nem no sumo com o filme com óleo. O aparecimento destes fungos pode ser devido a uma contaminação cruzada, visto que este ensaio estava a decorrer fisicamente perto dos ensaios antifúngicos.

Para uma melhor avaliação da turbidez dos sumos ao longo do tempo, determinou-se a densidade ótica a 640 nm (turbidez), tal como está representado na Figura 41.



**Figura 41** – Evolução da densidade ótica do sumo sem filme, com o filme controlo e com o filme com óleo 1:2 ao longo de 5 dias.

A absorvância do sumo sem filme apenas aumentou de 0,138 para 0,145 e a do sumo com o filme óleo 1:2 de 0,138 para 0,141 após 1 dia. No entanto, no sumo com o filme controlo a absorvância aumentou para 0,200 pelos motivos anteriormente referidos, mas após a sua centrifugação a absorvância diminuiu para 0,050. Após 4 dias, os sumos

com os filmes mantiveram-se estáveis enquanto a absorvância do sumo sem filme aumentou cerca de 7 vezes. Ao quinto dia, a densidade ótica do sumo sem filme duplicou em relação ao dia anterior enquanto a absorvância do sumo com o filme controlo apenas aumentou de 0,106 para 0,160 e com o filme óleo 1:2 aumentou de 0,271 para 0,318.

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana é um método rápido, embora indireto, para estimar a concentração celular. Este método não permite distinguir entre células viáveis e células mortas e não permite obter diretamente valores absolutos de concentração celular, sendo utilizado para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da densidade ótica. Assim, este ensaio qualitativo permitiu apenas concluir que os filmes à base de quitosana retardaram o aparecimento e crescimento das culturas microbianas que iriam deteriorar o sumo de maçã. Estes resultados parecem indicar que os filmes têm propriedades antimicrobianas.





## **4. CONCLUSÕES**



Neste trabalho foram desenvolvidos filmes à base de quitosana com incorporação de vários extratos obtidos a partir do bagaço de uva (extrato rico em polissacarídeos, óleos e ceras).

Os filmes à base de quitosana com incorporação do extrato rico em polissacarídeos (72 % de polissacarídeos, 22 % de proteínas e 6 % de compostos fenólicos) apresentaram a mesma solubilidade em água destilada que o filme de quitosana, mas revelaram ser ligeiramente mais solúveis na solução hidro-alcoólica ácida. Estes filmes demonstraram ter uma capacidade antioxidante superior aos filmes de quitosana. As propriedades mecânicas do filme não se alteraram com a adição deste extrato em relação ao filme de quitosana. Desta forma, estes filmes podem ter as mesmas aplicações que os filmes apenas constituídos por quitosana, com a vantagem adicional de terem um incremento da sua capacidade antioxidante.

Os filmes de quitosana com óleo extraído das grainhas de uva apresentaram valores de solubilidade inferiores relativamente aos filmes de quitosana, tanto em meio aquoso como na solução hidro-alcoólica ácida. Estes filmes também apresentaram uma maior atividade antioxidante que o filme controlo, visível quando se utilizaram os métodos de captura de radicais (ABTS e DPPH). As propriedades mecânicas, tais como a força de tensão no ponto de rutura, a elongação e a flexibilidade não se alteraram significativamente em relação ao filme de quitosana. Além disso, o filme com óleo parece ter melhores propriedades antifúngicas. O incremento na proporção de óleo nos filmes conduziu a um aumento da atividade antioxidante (DPPH e FRAP), não alterou significativamente as suas solubilidades e reduziu ligeiramente os valores dos parâmetros das propriedades mecânicas. Como grande parte dos frutos e legumes têm um pH ácido, constituem um meio desfavorável à aplicação de revestimentos de quitosana dado que esta se solubiliza nestes meios. A menor solubilidade em meios ácidos, a maior atividade antioxidante e as propriedades antimicrobianas destes filmes à base de quitosana com incorporação de óleos torna-os mais vantajosos pois protege mais eficazmente os produtos alimentares do efeito oxidativo e da contaminação microbiológica sem que se solubilizem.

Os filmes com incorporação das ceras das películas das uvas também demonstraram ter vantagens em relação aos filmes de quitosana. Estes filmes com ceras, apesar de não mostrarem diferenças significativas de solubilidade e das propriedades mecânicas, apresentaram atividade antioxidante relativamente superior quando medida com os

métodos de captura de radicais (ABTS e DPPH). O incremento da proporção de ceras nos filmes não alterou significativamente as suas propriedades. As ceras são maioritariamente constituídas por alcoóis, ácidos gordos e ácido oleanóico. Este ácido, que representa 30 % da composição das ceras presentes nas películas, inibe a ação dos microrganismos impedindo o processo fermentativo das uvas. Contudo um pequeno corte na baga inicia o processo fermentativo. Assim, uma aplicação possível a dar aos filmes à base de quitosana enriquecidos em ceras seria como uma película protetora adicional dos bagos de uva de mesa, pois estes filmes iriam aumentar a sua proteção física e química e, desta forma, evitar fermentação alcoólica das uvas.

Os filmes à base de quitosana produzidos por incorporação dos três extratos do bagaço de uva, devido às diferentes propriedades demonstradas, parecem ser promissores para aplicações alimentares.

## **5. TRABALHO FUTURO**



Como trabalho futuro, seria interessante determinar outras propriedades dos filmes à base de quitosana desenvolvidos, nomeadamente ter um conhecimento mais aprofundado das suas propriedades antimicrobianas relativamente a bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos. Além disso, seria importante estudar as suas propriedades de barreira, como a barreira ao vapor de água, ao oxigénio e ao dióxido de carbono.

Na produção dos filmes com ceras e óleo poderia tentar-se reduzir o tamanho das partículas para uma melhor dispersão nas soluções formadoras de filmes, utilizando por exemplo a microfluidização, para se obter filmes mais homogêneos.

Diferentes proporções de quitosana:extratos:glicerol poderiam ser testadas de forma a encontrar filmes com reduzida solubilidade em meio ácido, com atividade antioxidante melhorada e com melhores propriedades mecânicas, de forma a encontrar filmes mais resistentes, flexíveis e elásticos em relação aos filmes constituídos apenas por quitosana.

Tendo em conta as características intrínsecas de cada filme, poderiam ser testadas as aplicações alimentares mais apropriadas para cada um dos filmes desenvolvidos que apresentassem propriedades promissoras.





## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Wasteonline, Wasteonline, UK. <http://www.wasteonline.org.uk/index.aspx>. 27/12/2011, In depth information on waste. Plastic recycling information sheet, 2006.
2. Srinivasa, P.C. and Tharanathan, R.N., *Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses*, Food Reviews International, 2007, 23(1), 53-72.
3. Pitak, N. and Rakshit, S.K., *Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving Fresh-cut vegetables*, Lwt-Food Science and Technology, 2011, 44(10), 2310-2315.
4. Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A. and Giosafatto, C.V.L., *Transglutaminase Crosslinked Pectin- and Chitosan-based Edible Films: A Review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(3), 223-238.
5. R.N, T., *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*, Trends in Food Science & Technology, 2003, 14(3), 71-78.
6. Gomez-Estaca, J., Gomez-Guillen, M.C., Fernandez-Martin, F. and Montero, P., *Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films*, Food Hydrocolloids, 2011, 25(6), 1461-1469.
7. Krochta, J.M., *Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Protein-based Films and Coatings*, CRC Press LLC, 2002, Ch. 1, 1–41.
8. Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., del Rio, M.A. and Perez-Gago, M.B., *Antimicrobial Edible Films and Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: A Review*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(9), 872-900.
9. McHugh, T.H. and Krochta, J.M., *Sorbitol-plasticized vs glycerol-plasticized whey-protein edible films - integrated oxygen permeability and tensile property evaluation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(4), 841-845.
10. Jia, D.Y., Fang, Y. and Yao, K., *Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films*, Food and Bioproducts Processing, 2009, 87(C1), 7-10.

11. Chambi, H. and Grosso, C., *Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-polysaccharide-based films*, European Food Research and Technology, 2011, 232(1), 63-69.
12. CiênciaHoje, <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2010/01/embalagens-para-comer-03/01/2012>, 2010.
13. Hong, S.I. and Krochta, J.M., *Oxygen barrier properties of whey protein isolate coatings on polypropylene films*, Journal of Food Science, 2003, 68(1), 224-228.
14. Rico-PeÑA, D.C. and Torres, J.A., *Sorbic Acid and Potassium Sorbate Permeability of an Edible Methylcellulose-Palmitic Acid Film: Water Activity and pH Effects*, Journal of Food Science, 1991, 56(2), 497-499.
15. Odilio B. G. Assis, V.L.d.S., *Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações*, Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2003, 13(4), 223-228.
16. Fernandes, S.C.M., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P. and Gandini, A., *Novel materials based on chitosan and cellulose*, Polymer International, 2011, 60(6), 875-882.
17. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., *Functional Characterization of Chitin and Chitosan*, Current Chemical Biology, 3(2), 203-230.
18. Craveiro, A.C., *Quitosana, A Fibra do Futuro*, Fortaleza: Padetec, 2007.
19. Goosen, M.F.A., *Applications and Properties of Chitosan In Applications of Chitin and Chitosan*, Technomic Publications, 1997, Ch 1, 3-31.
20. Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., *Food applications of chitin and chitosans*, Trends in Food Science & Technology, 1999, 10(2), 37-51.
21. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*, International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1), 51-63.
22. Krajewska, B., Wydro, P. and Janczyk, A., *Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on Chitosan Interactions with Membrane Lipids in Langmuir Films*, Biomacromolecules, 2011, 12(11), 4144-4152.

23. Goy, R.C., de Britto, D. and Assis, O.B.G., *A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*, Polimeros-Ciencia E Tecnologia, 2009, 19(3), 241-247.
24. Wang, X.H., Du, Y.M., Fan, L.H., Liu, H. and Hu, Y., *Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and structure-activity study*, Polymer Bulletin, 2005, 55(1-2), 105-113.
25. Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L. and Porta, R., *Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life*, Lwt-Food Science and Technology, 2011, 44(10), 2324-2327.
26. Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z. and De Yao, K., *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan*, Journal of Applied Polymer Science, 2001, 79(7), 1324-1335.
27. Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H. and Yu, L.J., *Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65(2), 197-202.
28. Tsai, G.J. and Su, W.H., *Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli*, Journal of Food Protection, 1999, 62(3), 239-243.
29. Berger, R.G., Lunkenbein, S., Strohle, A. and Hahn, A., *Antioxidants in Food: Mere Myth or Magic Medicine?*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(1-3), 162-171.
30. Chen, A.S., Taguchi, T., Sakai, K., Kikuchi, K., Wang, M.W. and Miwa, I., *Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(9), 1326-1330.
31. Chien, P.J., Sheu, F., Huang, W.T. and Su, M.S., *Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice*, Food Chemistry, 2007, 102(4), 1192-1198.
32. Kosaraju, S.L., Weerakkody, R. and Augustin, M.A., *Chitosan-Glucose Conjugates: Influence of Extent of Maillard Reaction on Antioxidant Properties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(23), 12449-12455.
33. Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M. and Wood, E.J., *The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro*, Biomaterials, 2001, 22(22), 2959-2966.

34. Dutta, P.K., Dutta, J. and Tripathi, V.S., *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*, Journal of Scientific & Industrial Research, 2004, 63(1), 20-31.
35. Zhang, D. and Quantick, P.C., *Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (Litchi chinensis Sonn.) fruit*, Postharvest Biology and Technology, 1997, 12(2), 195-202.
36. Rodriguez, M.S., Albertengo, L.A. and Agullo, E., *Emulsification capacity of chitosan*, Carbohydrate Polymers, 2002, 48(3), 271-276.
37. Schulz, P.C., Rodriguez, M.S., Del Blanco, L.F., Pistonesi, M. and Agullo, E., *Emulsification properties of chitosan*, Colloid and Polymer Science, 1998, 276(12), 1159-1165.
38. Valdelúcia M. A. S. Grinevicius, L.P.W., Paola G. C. Santos, Reginaldo Geremias, Rogério Laus, Jacira Silvano, Mauro C. M. Laranjeira, Valfredo T. de Fávère, and Pedrosa., R.C., *Remediação de efluentes de indústria têxtil utilizando quitosana*, Sociedade Brasileira de Química ( SBQ).
39. Dutta, P.K., Ravikumar, M.N. and Dutta, J., *Chitin and chitosan for versatile applications*, Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews, 2002, C42(3), 307-354.
40. Majeti N.V, R.K., *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive and Functional Polymers, 2000, 46(1), 1-27.
41. Costa, S.A., Pozzani, L.S., Costa, S.M., Rogero, S.O., Cruz, A.S. and A., P., *Fibras Têxteis Híbridas à base de celulose e quitosana para aplicações médicas*, 18º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2008.
42. Hayashi, Y., Ohara, N., Ganno, T., Ishizaki, H. and Yanagiguchi, K., *Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion*, Journal of Dentistry, 2007, 35(11), 871-874.
43. No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z., *Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review*, Journal of Food Science, 2007, 72(5), R87-R100.
44. Baldwin, E.A. and Hagenmaier, R.D., *Introduction In Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, Taylor & Francis Group, 2012, Ch. 1, 1-8.
45. Sashiwa, H. and Aiba, S.-i., *Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials*, Progress in Polymer Science, 2004, 29(9), 887-908.

46. Pranoto, Y., Rakshit, S.K. and Salokhe, V.M., *Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin*, LWT - Food Science and Technology, 2005, 38(8), 859-865.
47. Joseph, C.S., Prashanth, K.V.H., Rastogi, N.K., Indiramma, A.R., Reddy, S.Y. and Raghavarao, K., *Optimum Blend of Chitosan and Poly-(epsilon-caprolactone) for Fabrication of Films for Food Packaging Applications*, Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(7), 1179-1185.
48. Siripatrawan, U. and Harte, B.R., *Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract*, Food Hydrocolloids, 2010, 24(8), 770-775.
49. John, J., Mani, R. and Bhattacharya, M., *Evaluation of compatibility and properties of biodegradable polyester blends*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2002, 40(12), 2003-2014.
50. Sarasam, A.R., Samli, A.I., Hess, L., Ihnat, M.A. and Madihally, S.V., *Blending Chitosan with Polycaprolactone: Porous Scaffolds and Toxicity*, Macromolecular Bioscience, 2007, 7(9-10), 1160-1167.
51. Baldwin, E.A., Nisperos, M.O., Hagenmaier, R.D. and Baker, R.A., *Use of lipids in coatings for food products*, Food Technology, 1997, 51(6), 56-&.
52. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., *Biological effects of essential oils – A review*, Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(2), 446-475.
53. Vargas, M., Perdonés, A., Chiralt, A., Chafer, M. and Gonzalez-Martinez, C., *Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films*, Food Hydrocolloids, 2011, 25(5), 1158-1164.
54. Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A. and González-Martínez, C., *Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on Penicillium italicum*, Carbohydrate Polymers, 2010, 82(2), 277-283.
55. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. and Chiralt, A., *Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films*, Food Hydrocolloids, 2012, 26(1), 9-16.

56. Mayachiew, P., Devahastin, S., Mackey, B.M. and Niranjan, K., *Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract*, Food Research International, 2010, 43(1), 125-132.
57. Altıok, D., Altıok, E. and Tihminlioglu, F., *Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications*, Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2010, 21(7), 2227-2236.
58. Schieber, A., Stintzing, F.C. and Carle, R., *By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments*, Trends in Food Science & Technology, 2001, 12(11), 401-413.
59. Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, X. and Bobet, R., *Valorization of Grape (Vitis vinifera) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(26), 7548-7555.
60. Silva, L.M.L.R.D., *Caracterização dos subprodutos da vinificação*, Millenium online (Revista do ISPV), 2003, 28, 123-133.
61. Marques, A.S.M.L.d.C., *Valorização Orgânica do Subproduto da Destilação do Bagaço de Uva*, Universidade de Aveiro, Departamento de Ambiente e Ordenamento, 2008.
62. Gonçalves, O.d.C.Q., *Pesquisa de compostos terpénicos do bagaço de Vitis vinifera L.. Estabelecimento de bases químicas e biológicas para o desenvolvimento de estratégias conducentes à sua valorização como produto de valor acrescentado.*, Universidade de Aveiro, Departamento de Química, 2009.
63. Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., Ma, Y. and Pohorly, J., *Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder*, Food Chemistry, 2009, 114(2), 570-576.
64. Baydar, N.G., Ozkan, G. and Cetin, E.S., *Characterization of grape seed and pomace oil extracts*, Grasas Y Aceites, 2007, 58(1), 29-33.
65. Deng, Q.A. and Zhao, Y.Y., *Physicochemical, Nutritional, and Antimicrobial Properties of Wine Grape (cv. Merlot) Pomace Extract-Based Films*, Journal of Food Science, 2011, 76(3), 309-317.



66. Casado, C.G. and Heredia, A., *Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (Vitis vinifera L.)*, Journal of Experimental Botany, 1999, 50(331), 175-182.
67. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, Analytical Chemistry, 1956, 28(3), 350-356.
68. Silva, R.d.N., Monteiro, V.N., Alcanfor, J.D.A.X., Assis, E.M. and Asquieri, E.R., *Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003, 23, 337-341.
69. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. and Stone, B.A., *A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis*, Carbohydrate Research, 1983, 113(2), 291-299.
70. Coimbra, M.A., Waldron, K.W. and Selvendran, R.R., *Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (Olea europaea L.)*, Carbohydrate Research, 1994, 252(0), 245-262.
71. Selvendran, R.R., March, J.F. and Ring, S.G., *Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber*, Analytical Biochemistry, 1979, 96(2), 282-292.
72. Ruiz, R.P., Wrolstad, R., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Sporns, P., *The Bicinchoninic Acid (BCA) for Determination of Total Protein In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
73. Huang, D.J., Ou, B.X. and Prior, R.L., *The chemistry behind antioxidant capacity assays*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6), 1841-1856.
74. Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M., *Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent*, Nature Protocols, 2007, 2, 875 - 877.
75. Aued-Pimentel, S., Lago, J.H.G., Chaves, M.H. and Kumagai, E.E., *Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from Sterculia striata St. Hil. Et Nauds seed oil*, Journal of Chromatography A, 2004, 1054(1–2), 235-239.

76. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9-10), 1231-1237.
77. Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P.J. and Rice-Evans, C.A., *Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 282(5), 1161-1168.
78. Passos, C.P., Silva, R.M., Da Silva, F.A., Coimbra, M.A. and Silva, C.M., *Supercritical fluid extraction of grape seed (Vitis vinifera L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity*, Chemical Engineering Journal, 2010, 160(2), 634-640.
79. Tucker, M.P., Nguyen, Q.A., Eddy, F.P., Kadam, K.L., Gedvilas, L.M. and Webb, J.D., *Fourier transform infrared quantitative analysis of sugars and lignin in pretreated softwood solid residues*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 91-3, 51-61.
80. Schmitt, J. and Flemming, H.-C., *FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis*, International Biodeterioration & Biodegradation, 1998, 41(1), 1-11.
81. Yang, L. and Zhang, L.-M., *Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources*, Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3), 349-361.
82. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*, Analytical Biochemistry, 1996, 239(1), 70-76.
83. Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X. and Zou, G., *Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles*, Journal of Applied Polymer Science, 2008, 107(2), 891-897.
84. Santos, C., Seabra, P., Veleirinho, B., Delgadillo, I. and da Silva, J.A.L., *Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes*, European Polymer Journal, 2006, 42(12), 3277-3285.
85. Cunha, Â.M.M.V.d., *Desenvolvimento de filmes de quitosana com atividade antioxidante*, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2011

86. Munoz-Robredo, P., Robledo, P., Manriquez, D., Molina, R. and Defilippi, B.G., *Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes*, Chilean Journal of Agricultural Research, 2011, 71(3), 452-458.
87. González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M.C., López, F. and Femenia, A., *Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems*, LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(10), 1580-1586.
88. Deng, Q., Penner, M.H. and Zhao, Y.Y., *Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins*, Food Research International, 2011, 44(9), 2712-2720.
89. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. and Schieber, A., *Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(14), 4360-4367.
90. Jayani, R.S., Saxena, S. and Gupta, R., *Microbial pectinolytic enzymes: A review*, Process Biochemistry, 2005, 40(9), 2931-2944.
91. Ridley, B.L., O'Neill, M.A. and Mohnen, D., *Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling*, Phytochemistry, 2001, 57(6), 929-967.
92. Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M.A. and Pellerin, P., *Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides*, Carbohydrate Polymers, 2001, 45(4), 315-323.
93. Goncalves, F.J., Rocha, S.M. and Coimbra, M.A., *Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material*, Food Chemistry, 2012, 134(2), 957-963.
94. Dalonso, N., Ignowski, E., Monteiro, C.M.A., Gelsleichter, M., Wagner, T.M., Silveira, M.L.L. and Silva, D.A.K., *Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (Allium sativum L.): proposta de metodologia alternativa*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009, 29, 793-797.
95. Fernandes, S.C.d.M., *Novos materiais baseados em quitosano, seus derivados e fibras de celulose*, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2010
96. Byler, D.M. and Susi, H., *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra*, Biopolymers, 1986, 25(3), 469-487.

97. Pardo, J.E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A. and Alonso, G.L., *Characterization of grape seed oil from different grape varieties (Vitis vinifera)*, European Journal of Lipid Science and Technology, 2009, 111(2), 188-193.
98. Zhang, Q., Liu, C., Sun, Z., Hu, X., Shen, Q. and Wu, J., *Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Food Chemistry, 2012, 132(3), 1607-1613.
99. Rosa, A.D., Linzmaier, T. C., *Determinação do tempo de permanência do ácido oleanóico em mosto de uvas em fermentação espontânea a partir de leveduras isoladas da flora nativa da Serra Gaúcha In Ciências Agrárias*, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, UCS, 22(207), 231.
100. Maricato, É.S.O., *Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com actividade antioxidante*, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2010
101. Machado, R.M.D., Toledo, M.C.F. and Vicente, E., *Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure*, European Food Research and Technology, 2009, 229(3), 383-389.
102. Hosseini, M.H., Razavi, S.H. and Mousavi, M.A., *Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils*, Journal of Food Processing and Preservation, 2009, 33(6), 727-743.
103. Karadag, A., Ozcelik, B. and Saner, S., *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities*, Food Analytical Methods, 2009, 2(1), 41-60.
104. Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S.M.R., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J. and Hadian, M., *Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract*, Lwt-Food Science and Technology, 2012, 46(2), 477-484.
105. Yoshida, C.M.P., Oliveira, E.N. and Franco, T.T., *Chitosan Tailor-Made Films: The Effects of Additives on Barrier and Mechanical Properties*, Packaging Technology and Science, 2009, 22(3), 161-170.
106. Pereda, M., Amica, G. and Marcovich, N.E., *Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films*, Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2), 1318-1325.

